

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"**



**Dottorato di Ricerca in  
"Riproduzione, Sviluppo ed Accrescimento  
dell'Uomo"**

**Coordinatore: Prof. Claudio Pignata**

**Tesi di Dottorato**

***"Patologia cervicale e nuove metodologie diagnostico-  
terapeutiche"***

**Tutore  
Prof. Carmine Nappi**

**Candidato  
Dott.ssa Giada Lavitola**

**Anno Accademico 2008/2009**

## INDICE

### INTRODUZIONE:

La cervice uterina .....	pag 3
<i><u>Pubblicazione:</u> <b>Le infezioni vulvo-vaginali in pazienti HIV+.</b> WHD, Ed Momento Medico, No 2, 2009.</i>	
<i><u>Pubblicazione:</u> <b>Case report: vaginosi e HPV.</b> WHD, Ed Momento Medico, 2007.</i>	
<i><u>Pubblicazione:</u> <b>Contraccettivi ormonali e rischio oncologico.</b> Il Ginecologo, Vol. 4, No 2-3, giugno-settembre 2009.</i>	
Infezione genitale da HPV: dimensioni del problema e diagnosi .....	pag 16
<i><u>Pubblicazione:</u> <b>Diagnostica dell'HPV.</b> Il Ginecologo, Vol 3, No 3, settembre 2008.</i>	
Epidemiologia dei genotipi di HPV ad alto rischio .....	pag 25
Nostra esperienza .....	pag 31
<i><u>Pubblicazione:</u> <b>Varianti genotipiche di HPV ad alto rischio di donne immigrate in Campania.</b> Congresso Straordinario AGUI: Aggiornamenti in Ostetricia e Ginecologia. Roma, 18-19 maggio 2007.</i>	
Prevenzione primaria dell'infezione da HPV: i due vaccini, analisi critica .....	pag 37

### CAPITOLO 1: patologia pre-neoplastica e neoplastica dell'esocervice

Le lesioni preneoplastiche e nostra esperienza.....	pag 63
Gestione dei risultati dubbi e loro significato in post-menopausa .....	pag 76
Nostra esperienza.....	pag 79
<i><u>Pubblicazione:</u> <b>Atypical squamous cells and low squamous intraepithelial lesions in postmenopausal women: implications for management.</b> European Journal of Obstetrics &amp; Gynecology and Reproductive Biology, 140: 269-274; 2008.</i>	
I tumori squamosi della cervice uterina: percorsi clinici.....	pag 91
Tumori squamosi rari: carcinoma neuroendocrino, nostra esperienza .....	pag 99



Pubblicazione: **Tumore neuroendocrino a piccole cellule della cervice uterina: case report.** 1° Congresso Nazionale della Federazione Italiana di Ostetricia e Ginecologia, Roma 5-7 novembre 2008.

## **CAPITOLO 2: patologia pre-neoplastica e neoplastica dell'endocervice**

Le lesioni ghiandolari e i percorsi diagnostici .....	pag 108
L'adenocarcinoma della cervice uterina, in situ ed invasivo .....	pag 118
Il canale cervicale come estensione della pat neoplastica endometriale.....	pag 129
Accuratezza diagnostica di ecografia transvaginale, risonanza magnetica ed isteroscopia nella valutazione dell'invasione del canale cervicale in pazienti affette da tumore dell'endometrio: la nostra esperienza .....	pag 154

Pubblicazione: **Evaluation of cervical involvement in endometrial carcinoma: a comparison between three different techniques.** Abstract of: World Congress of Gynecologic Endoscopy, Bari 4-7 giugno 2008.

Pubblicazione: **Evaluation of cervical involvement in endometrial carcinoma: a comparison between three different techniques.** Submitted to Gynecologic Oncology.

Il canale cervicale nelle lesioni squamose della cervice uterina .....	pag 167
--	---------

## **CAPITOLO 3: tecniche diagnostiche per lo studio della cervice uterina**

Tecniche tradizionali: indicazioni e limiti.....	pag 171
L'endocervicoscopia, una nuova tecnica: la nostra esperienza .....	pag 186

Pubblicazione: **Endocervicoscopy.** Abstract of: World Congress of Gynecologic Endoscopy, Bari 4-7 giugno 2008.

Pubblicazione: **A new technique for the evaluation of cervical canal: Endocervicoscopy.** Submitted to Fertility and Sterility

<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	pag 213
---------------------------	---------

## **INTRODUZIONE**

### **La cervice uterina**

La cervice uterina è una struttura complessa dell'apparato genitale femminile. È una stretta porzione cilindrica, di circa 2-4 centimetri di lunghezza, anatomicamente collocata tra vagina e corpo dell'utero e viene spesso considerata come “un punto di passaggio” tra l'ambiente esterno e quello interno dell'apparato riproduttivo femminile.

Anatomicamente riconosciamo: l'esocervice, ovvero quella porzione della cervice uterina che si affaccia in vagina e che, come quest'ultima, è rivestita da epitelio squamoso pluristratificato; e l'endocervice, ovvero, quel canale che comunica da un lato con l'ambiente vaginale attraverso l'orificio uterino esterno (OUE) e dall'altro con la cavità uterina attraverso l'orificio uterino interno (OUI) ed è rivestito da epitelio cilindrico monostratificato, costituito da rare cellule ciliate intercalate da numerose cellule muco secernenti.

Questa duplice struttura fa sì che la cervice uterina possa essere da un lato, per la sua componente squamosa, sede di lesioni pre-neoplastiche o francamente neoplastiche proprie dell'esocervice, nonché bersaglio di tutte quelle patologie infettive dovute alla contaminazione, o semplice alterazione, dell'ambiente vaginale; dall'altro lato, per la sua componente cilindrica, può essere “incipit” di lesioni ghiandolari proprie dell'endocervice o “continuum” di lesioni neoplastiche del corpo uterino.

Per comprendere meglio quali sono i meccanismi che determinano l'insorgenza di tutte queste lesioni a livello cervicale, dobbiamo prima soffermarci sulla fisiologia del tratto genitale distale.

La cervice uterina è fisiologicamente soggetta a cicliche variazioni mensili in relazione alle oscillazioni ormonali regolate dal ciclo ovario, e questo si riflette in modificazioni dell'epitelio di rivestimento, del muco e dell'immunità locale.

Gli ormoni femminili determinano modificazioni morfologiche e funzionali dell'epitelio di rivestimento, influenzando il ritmo di replicazione cellulare e lo spessore dell'epitelio, la desquamazione dello strato superficiale ed il metabolismo delle cellule dei vari strati. Durante la fase follicolare gli estrogeni stimolano progressivamente la divisione cellulare dell'epitelio di rivestimento pluristratificato esocervicale. Dal decimo al quattordicesimo giorno del ciclo, il numero degli strati aumenta da 20 a 40. L'aumento di spessore dello strato superficiale si accompagna a desquamazione cellulare, più accentuata nella fase preovulatoria. Alla fine della fase follicolare, le cellule degli strati intermedio, di trasposizione e superficiale mostrano un alto contenuto di glicogeno nel loro citoplasma, aumenta il numero di giunzioni intercellulari ed è apprezzabile una variazione nel metabolismo delle cellule dello strato basale che mostrano un progressivo accumulo di gocce lipidiche. L'epitelio cilindrico endocervicale, in questa fase, è costituito da cellule con citoplasma relativamente denso e basofilo, il nucleo ha forma ellittica o sferica. Alla fine della fase follicolare, il citoplasma delle cellule cilindriche si riempie di abbondante e chiaro muco che spinge il nucleo verso la porzione basale della cellula.

Nella fase luteinica si verifica l'aumento del progesterone. Esso è responsabile dell'inibizione della moltiplicazione cellulare dell'epitelio squamoso, della riduzione

delle giunzioni desmosomiali e quindi dell'incremento della desquamazione cellulare. Questi fenomeni determinano una riduzione notevole del numero degli strati cellulari. Si assiste, inoltre, ad una infiltrazione leucocitaria nella tonaca propria che determina lo scollamento dello strato basale.

L'analisi al microscopio dell'esame citologico, ottenuto con lo striscio cervico-vaginale, può dare, oltre che, naturalmente, informazioni sulla presenza di affezioni vaginali o di neoplasie cervicali, anche indicazioni utili sulla funzione ovarica o sulla efficacia di terapie estro-progestiniche.

L'indice di maturazione dell'epitelio di rivestimento e l'entità dei fenomeni desquamativi che dipendono direttamente dal grado di proliferazione raggiunto durante la fase estrogenica, si ripercuotono sulle caratteristiche delle cellule osservate al microscopio. Ad esempio, uno striscio atrofico, con marcata riduzione del livello di maturazione dell'epitelio squamoso, indica l'assenza di attività estrogenica, mentre uno striscio composto prevalentemente da cellule squamose eosinofile indica un effetto estrogenico endogeno od esogeno. Anche l'epitelio ghiandolare endocervicale subisce le variazioni ormonali, ma queste sono di più difficile evidenziazione al Pap-test.

Gli estrogeni inducono la completa maturazione degli epiteli. Lo striscio cervico-vaginale all'inizio della fase estrogenica, mostra la presenza di cellule squamose dello strato intermedio raggruppate in clusters e cellule superficiali sparse; in fase preovulatoria, è dominante la presenza di cellule squamose superficiali completamente mature, con nucleo picnotico e citoplasma acidofilo, isolate tra loro. Eritrociti, leucociti e macrofagi sono comunemente evidenziabili all'inizio della fase

estrogenica e divengono scarsi fino a scomparire in fase ovulatoria. Le cellule endocervicali hanno citoplasma basofilo e sferico con nucleo centrale.

Al momento dell'ovulazione lo striscio è composto soprattutto da cellule superficiali squamose di grosse dimensioni ed intensamente eosinofile, i leucociti sono infrequenti, esso viene definito "pulito". Le cellule endocervicali divengono rigonfie e larghe con citoplasma ripieno di muco chiaro, e restano poi immutate fino alla fine del ciclo.

Durante la fase progestinica si assiste ad una graduale riduzione nella proporzione di cellule squamose superficiali che sono sostituite da cellule dello strato intermedio. È possibile identificare rare cellule navicolari (cellule intermedie con depositi gialli di glicogeno), i leucociti divengono numerosi. Verso la fine del ciclo le cellule intermedie divengono prevalenti formano piani continui o clusters. Subito prima del sanguinamento mestruale, a causa della citolisi indotta dai lattobacilli, compaiono nuclei spogli e frammenti cellulari accompagnati da un incremento di leucociti che danno allo striscio un aspetto "sporco"(1,2).

Le modificazioni cito-istologiche che si evidenziano in relazione al ciclo ovarico possono essere motivate data la presenza di modificazioni molecolari che evidenziano una variazione dell'espressione dei recettori per estrogeno e progesterone a livello cervicale: in particolare, è stato dimostrato che in fase estrogenica si verifica una lieve-moderata espressione di recettori estrogenici nello strato basale e parabasale, l'espressione è ridotta in fase progestinica. Assente l'espressione di recettori progestinici in tutto l'epitelio esocervicale (3).

Ulteriori modificazioni si manifestano a carico del muco cervicale. Esso è secreto dalle ghiandole endocervicali ed è composto da una fase viscosa, costituita

prevalentemente da glicoproteine insolubili (mucoproteine e mucina) e da una fase liquida, il plasma cervicale, costituita da numerosi enzimi, proteine, polisaccaridi, lipidi e sali minerali in soluzione. La presenza, nel muco cervicale, di immunoglobuline e soprattutto di lattoferrina, proteina che inibisce la crescita batterica, costituisce una vera barriera tra l'ambiente vaginale e quello uterino, favorendo l'asepsi della cavità uterina. La concentrazione di lattoferrina si modifica in rapporto al ciclo mestruale, essendo ridotta prima del sanguinamento mestruale e sensibilmente elevata subito dopo. La concentrazione plasmatica di lattoferrina non mostra analoghe modificazioni (4).

Anche la secrezione e la composizione del muco variano in rapporto al ciclo mestruale: nella prima parte del ciclo vengono secreti circa 50-60 mg/die di muco; nel periodo preovulatorio, la quantità di muco aumenta notevolmente fino a raggiungere circa 600-700 mg/die; nella fase luteinica i valori tornano ai livelli basali. Le ghiandole endocervicali sintetizzano e secernono muco in risposta agli alti tassi di estrogeni.

Andiamo ora ad analizzare gli effetti degli ormoni sull'immunità del tratto genitale distale.

La risposta immunitaria viene caratteristicamente differenziata in risposta immunitaria innata e risposta immunitaria specifica.

La prima, a livello vaginale, corrisponde alla presenza ed allo spessore dell'epitelio di rivestimento ed all'ambiente vaginale a pH acido. A livello cervicale, invece, è rappresentata dalla presenza del muco, dalla secrezione di IgA e dall'accumulo di lattoferrina. Le modificazioni dell'immunità innata, in relazione al ciclo mestruale, sono in parte già state trattate. La continuità dell'epitelio di

rivestimento, la secrezione di glicoproteine e la presenza di muco, le alte concentrazioni di lattoferrina, in fase estrogenica, sono tutti elementi protettivi dell'ambiente vaginale che impediscono la colonizzazione e la diffusione di agenti patogeni.

La vagina, però, non è un ambiente sterile. Questa può essere, piuttosto, paragonata ad una nicchia ecologica nella quale coesistono microrganismi in equilibrio dinamico con l'ambiente e fra loro. Tale equilibrio è suscettibile di modificazioni da parte di fattori endogeni ed esogeni quali: età, produzione di estrogeni, attività sessuale, presenza di stati patologici. Ed è proprio una alterazione di tale equilibrio ad essere responsabile di una aumentata suscettibilità alle infezioni. Il secreto vaginale contiene una carica batterica pari a circa  $10^6$ – $10^9$  unità formanti colonie/gr: la flora batterica vaginale. Essa è costituita da numerose specie microbiche acido tolleranti come *Escherichia Coli*, *Streptococco*, i *Difteroidi*, il *Corynebacterium vaginalis* e molti anaerobi e microaerofili.

I microbioti predominanti sono rappresentati dai lactobacilli di Doderlein che comprendono il *L.Acidophilus*, *L.Casei*, *L.Fermentum* ed il *L.Celloblosus*. Tali microrganismi hanno la capacità di fermentare il glicogeno ad acido lattico, l'effetto finale è l'elevata concentrazione di idrogenioni  $H^+$  che rende l'ambiente vaginale acido (pH fisiologico di 4 – 4.5). Gli  $H^+$  si legano all'acqua formando perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). Tale molecola è tossica per un gran numero di specie batteriche. L'azione combinata di  $H_2O_2$ , di perossidasi uterina (prodotta dalla cervice e dall'endometrio) e di ioni  $Cl^-$  e  $I^-$ , induce l'attivazione diretta dei polimorfonucleati, che esplicano un'azione battericida negli spazi intercellulari epiteliali. Alcuni ceppi di lactobacilli possono produrre una notevole quantità di molecole ad azione

antimicrobica come Lactocidina, Acidolina, Acidofillina, Lactacina ed interferiscono con l'adesione batterica alle cellule epiteliali della vagina.

L'immunità innata, oltre a costituire la prima linea di difesa contro i microrganismi patogeni, gioca un ruolo importante nell'induzione della risposta immunitaria specifica.

La risposta immunitaria specifica (o acquisita) è a sua volta differenziata in risposta umorale, correlata alla differenziazione di Cellule B ed alla produzione di anticorpi, e in risposta immunitaria cellulare i cui attori principali sono i linfociti T. Distinguiamo i linfociti T citotossici, che legano le cellule bersaglio e ne inducono la lisi, e i linfociti T helper che a loro volta si differenziano in Th1, in grado di attivare i macrofagi, e in Th2 in grado di attivare le cellule B. Mentre la risposta anticorpale protegge contro infezioni micotiche e batteriche, la risposta cellulo-mediata è rivolta prevalentemente contro le infezioni virali e batteriche intracellulari.

Le difese immunitarie acquisite a livello vaginale sono influenzate dai livelli di immunoglobuline e di citochine, presenti nel muco vaginale, nonché dal ciclo ovarico. Donne in età fertile presentano una alta concentrazione di immunoglobuline nel muco cervicale. Le IgA sono l'isotipo predominante, queste sono attivamente secrete sia in risposta agli stimoli antigenici, sia in relazione alle fasi del ciclo ovarico. le IgG, invece, sono maggiormente concentrate nel distretto ematico e linfatico e la quota presente nel muco cervicale deriva dalla proporzionale trasudazione degli anticorpi da questi distretti.

I livelli di Immunoglobuline nel muco cervicale aumentano in fase preovulatoria in corrispondenza del picco estrogenico che amplifica l'espressione della componente secretoria e il trasporto selettivo delle IgA nel lume (5). Il picco correla



con l'aumento di IL-1 $\beta$ , citochina coinvolta nella produzione di IgA, che induce la differenziazione di cellule T sulla superficie della mucosa e stimola la produzione da parte delle cellule endometriali di IL-6, citochina in grado di indurre la differenziazione di linfociti Th2 (6).

Concorrono all'immunità vaginale anche le cellule immunitarie dell'epitelio vaginale rappresentate dai linfociti T citotossici, citotipo predominante, i linfociti T helper, i macrofagi tissutali, più abbondanti in fase estrogenica, e le cellule di Langerhans in minor numero. Risultano assenti, invece, i linfociti B e i monociti. Questi ultimi si localizzano presso la lamina basale, tra la lamina propria e le papille del tessuto connettivo, e non correlano direttamente con il ciclo ormonale. Viceversa gli estrogeni mostrano un potenziale effetto di immunomodulazione sui linfociti T helper e citotossici, sui macrofagi e sulla sintesi e liberazione di citochine ed anticorpi.

Gli estrogeni sembrano agire in diverse fasi e su molteplici meccanismi che regolano la risposta immunitaria tra cui: la replicazione e l'attivazione di linfociti e monociti, la funzione di cellule dendritiche, la risposta T cellulare, la sintesi di citochine, la differenziazione e la sopravvivenza dei linfociti B, la risposta anticorpale e l'attività delle cellule NK. Gli effetti ed i meccanismi di immunomodulazione degli estrogeni sono ancora da definire, a volte di difficile valutazione, considerando anche che i recettori per gli estrogeni sono molteplici e possono essere espressi, in modo variabile, nelle cellule del sistema immunitario anche a seconda dello stadio di differenziazione delle cellule.

Gli estrogeni sopprimono lo sviluppo e la differenziazione di cellule B e T, inducendo l'atrofia del timo nei ratti, allo stesso modo, la differenziazione delle cellule dendritiche in vitro è inibita. Essi inducono la apoptosi dei monociti.

La loro azione sulla immunità umorale è invece opposta, questi infatti aumentano la produzione di immunoglobuline, probabilmente tramite la produzione di IL-10 che inibisce la differenziazione di Th1 ed incrementa l'espressione di recettori MHC di classe II sui linfociti B. Così come aumentano anche la produzione di autoanticorpi rendendosi responsabili dell'aumentata suscettibilità di malattie autoimmuni in donne fertili. L'incremento di produzione di Ig è associato alla espressione di molecole (bcl-2, shp-1, cd22 e VCAM-1) coinvolte nella attivazione e nella sopravvivenza delle cellule B.

Meno chiaro l'effetto degli estrogeni sulla risposta T cellulare. Lo stato gravidico, caratterizzato da alti livelli estrogenici, influenza la risposta immunitaria cellulare favorendo un *switch* verso la risposta Th2 che ricordiamo essere coinvolta nell'attivazione della risposta umorale. È evidente che gli estrogeni possono, però, indurre anche la sintesi di citochine Th1. La risposta immunitaria cellulare viene, infatti, indotta e mantenuta dalla produzione di citochine pro- o antinfiammatorie. Di particolare rilievo sono l'IL-2, l'IFN- $\gamma$  ed il TNF- $\alpha$ . Queste inducono la differenziazione dei linfociti T *helper* in linfociti Th1, primariamente coinvolti nell'induzione di cellule T ad attività citotossica, stimolano la sintesi di IgG e sono caratteristicamente aumentate dopo trattamento con estro-progestinici esogeni. L'estradiolo incrementa la trascrizione e la sintesi del IFN- $\gamma$ , data la presenza di ERE (elementi responsivi agli estrogeni) a livello della zona promoter del gene. Esso è in grado anche di favorire l'accumulo di cellule Th1.

Gli estrogeni, infine, hanno effetti variabili sulla sintesi di altre citochine a seconda del tipo cellulare da cui vengono prodotte. Essi, incrementando la sintesi del TNF- $\alpha$ , inducono la trascrizione dell'enzima iNOS nei macrofagi e la produzione di ossido nitrico, un potente microbicide (7, 8).

Questi dati, che sembrano dimostrare che gli estrogeni tendono a migliorare la risposta immunitaria dell'organismo, non sono sempre confermati clinicamente. Il trattamento con terapia estro-progestinica contraccettiva è, infatti, correlato ad un incremento del rischio di sviluppare infezioni da *Clamidia Trachomatis*; dati contrastanti sono presenti in letteratura circa le infezioni da Gonorrea e da *Herpes Simplex*; nessuna correlazione è presente tra l'assunzione di contraccettivi orali e le infezioni da *Trichomonas Vaginalis* e Sifilide.

La sensibilità alle infezioni, e lo sviluppo di patologie cervico-vaginali non sono ascrivibili ad un unico fattore determinante sia esso esogeno, come il contatto con agenti patogeni, il comportamento sessuale, l'uso frequente di antibiotici o spermicidi, sia esso endogeno, come lo stato ormonale e l'età. Tutti questi elementi concorrono nel determinare un disequilibrio nel complesso ecosistema vaginale ed un prevalere dei meccanismi di virulenza e patogenicità di organismi commensali o patogeni sui meccanismi di difesa dell'organismo.

È ben noto che una alterazione dell'ecosistema vaginale comporta lo scatenarsi sia di infezioni endogene, che derivano da una crescita abnorme di microrganismi normalmente presenti in vagina o provenienti dal tratto gastro-intestinale, ed includono soprattutto le Vaginosi Batteriche e le Candidosi, sia di infezioni iatrogene dovute all'induzione del contatto con l'agente patogeno attraverso procedure mediche (parto, aborto, IUD, interventi chirurgici), ed infine di infezioni

sessualmente trasmesse causate da batteri, parassiti e virus che vengono trasmessi attraverso rapporti sessuali con partner infetto e si manifestano se trovano delle condizioni favorevoli.

Le infezioni endogene sono le più frequenti. La microflora vaginale è, come abbiamo visto, formata da una varietà di microrganismi diversi. Nel momento in cui, la normale flora vaginale, i cui attori fondamentali sono i Lattobacilli di Doderlein, è rimpiazzata da un'aumentata crescita di *G. vaginalis*, batteri anaerobi e *Mycoplasma hominis*, si parla di Vaginosi Batterica (BV), più comune patologia vaginale tra le donne in età riproduttiva. La vaginosi batterica è quindi, più che un'infezione, uno squilibrio microbico caratterizzato da una marcata riduzione fino alla assenza totale di Lattobacilli, una proliferazione massiva e prevalente di *Gardnerella vaginalis* e di anaerobi facoltativi (*Prevotella*, *Mobiluncus*, *Peptostreptococcus*).

Le infezioni da Candida costituiscono la seconda causa di vaginiti in donne in età fertile. La colonizzazione dell'ambiente vaginale da *Candida Albicans* è molto frequente, tanto da essere considerato un abitante normale della flora vaginale. La Candida è un fungo dimorfico. Il fenotipo caratteristico delle fasi di estensione, disseminazione e colonizzazione asintomatico è la blastospora. Il cui rilievo è frequente nelle secrezioni vaginali di donne sane. Il secondo fenotipo è la forma miceliale, capace di invadere i tessuti e di dare origine alla candidosi vaginale.

La tricomoniassi è, infine, la terza causa più comune di vaginite nel mondo, con un'incidenza annuale pari a 170 milioni di casi, essa rappresenta una delle più frequenti malattie a trasmissione sessuale. L'infezione può essere asintomatica (nel 15-50% dei casi con normale flora vaginale e pH) o dare origine a segni clinici caratteristici (prurito e bruciore intenso). L'agente patogeno è il *Trichomonas*

*Vaginalis*, un protozoo flagellato parassita della mucosa vaginale. Esso provoca un danno meccanico dell'epitelio di superficie, liberando tossine, con perdita degli strati superficiale ed intermedio per citolisi.

Le infezioni da Candida, le Vaginosi Batteriche e le Tricomoniassi possono essere, esse stesse, causa, o concausa, di infezioni da parte di altri patogeni come ad esempio l'*Herpes Simplex*, la *Chlamydia*, l'HIV, in quanto determinano delle caratteristiche alterazioni a carico dell'ambiente vaginale, tra cui l'interruzione della continuità dell'epitelio vaginale, in presenza di Tricomoniassi e l'alterazione del pH acido vaginale in presenza di Vaginosi Batteriche, correlata alla riduzione della colonizzazione dei lattobacilli.

La *Chlamydia T.* e la *Neisseria Gonorrhoea* sono patogeni responsabili, in circa il 50% dei casi, di una condizione infiammatoria marcata, la cervicite, spesso associata ad una infezione sessualmente trasmessa. Una seconda forma di cervicite definita come "cervicite non specifica", o "cervicite non gonococcica, non clamidica", è indotta da numerosi altri agenti patogeni tra cui *Mycoplasma genitalium*, *M. Hominis*, *Ureaplasma Urealyticum*, *Trichomonas Vaginalis*, *Herpes Simplex* e *Gardenerella Vaginalis*. La cervicite è stata chiamata in causa come fattore determinante l'aumento del rischio di trasmissione dell'HIV. Una condizione infiammatoria cronica, con la produzione di alte concentrazioni di citochine (IL-1), induce un aumento della replicazione virale, determinando un incremento della concentrazione del virus nel muco cervicale, la distruzione dell'epitelio di rivestimento amplifica la suscettibilità all'infezione. Inoltre, le malattie sessualmente trasmesse, portano al reclutamento ed alla attivazione delle cellule immunitarie, aumentando il numero di cellule target per l'HIV (9).

Una condizione di infiammazione cronica è stata spesso associata allo sviluppo di cancro epiteliale. Sembra essere plausibile, quindi, una correlazione tra la cervicite cronica e lo sviluppo del cancro cervicale. In particolare, infezioni da *Chlamidia*, HSV, *Trichomonas*, CMV e Vaginosi Batteriche, sono state definite come co-fattori nello sviluppo del cancro della cervice uterina (10).

Le alterazioni epiteliali indotte da questi agenti infettanti e le reazioni infiammatorie ed immunitarie che ne conseguono, così come le modificazioni dell'epitelio cervicale indotte dall'assetto ormonale con le fisiologiche trasformazioni che ne derivano (proliferazione e trasformazione dell'epitelio cilindrico in epitelio metaplastico ed in epitelio squamoide), costituiscono delle condizioni favorevoli all'interazione tra la cervice uterina con quello che oggi viene definito "il principale artefice nella patogenesi delle lesioni cervicali": il Papilloma Virus Umano (HPV).



A n n o 4 • N u m e r o 2 • 2 0 0 9

WH

D

W o m a n ' s H e a l t h & D i s e a s e s

**EDITOR IN CHIEF**

Fausto Boselli

**EDITORIAL BOARD**

Maggiorino Barbero

Massimo Capodanno

Andrea Ciavattini

Paolo Cristoforoni

Paolo Inghirami

Daria Minucci

Giancarlo Mojana

Roberto Piccoli

Paolo Scirpa

Roberto Senatori

Francesco Sopracordevole

 **MOMENTO  
MEDICO**



# Le infezioni vulvo-vaginali in pazienti HIV+

Roberto Piccoli, Matilde Sansone, Nicoletta De Rosa, Angelo Cavallaro, Neri Stella, Pierluigi Giampaolino, Giada Lavitola, Giuseppe Bifulco

Dipartimento di Scienze Ostetriche, Ginecologiche, Urologiche e di Medicina della Riproduzione Umana  
Università degli Studi di Napoli "Federico II"

## Introduzione

La vagina è un'importante barriera che impedisce la risalita di microrganismi patogeni verso gli organi genitali interni.

I meccanismi di difesa che costituiscono tale barriera sono: l'immunità innata (o aspecifica) rappresentata dal muco cervicale, dall'ambiente vaginale acido e dall'epitelio di rivestimento, e l'immunità specifica (immunità cellulare ed umorale).

La presenza, nel muco cervicale, di immunoglobuline, macrofagi citochine e, soprattutto, di lattoferrina, proteina che inibisce la crescita batterica, costituisce una vera barriera tra l'ambiente vaginale e quello uterino, favorendo l'asepsi della cavità uterina; le donne in età fertile presentano un'alta concentrazione di immunoglobuline, in particolare IgA, mentre le IgG sono maggiormente concentrate nel distretto ematico e linfatico; quelle presenti nel muco cervicale derivano dalla trasudazione degli anticorpi da questi distretti.

Concorrono all'immunità vaginale anche le cellule immunitarie dell'epitelio vaginale rappresentate dai linfociti T citotossici, citotipo predominante, i linfociti T helper, i macrofagi tissutali e le cellule di Langerhans in minor numero; risultano assenti, invece, i linfociti B e i monociti. Queste

cellule si localizzano presso la lamina basale tra la lamina propria e le papille del tessuto connettivo.

La secrezione e la composizione del muco variano in rapporto al ciclo mestruale: nel periodo preovulatorio, la quantità di muco aumenta notevolmente. Le ghiandole endocervicali sintetizzano e secernono muco in risposta agli alti tassi di estrogeni.

Lo spessore dell'epitelio di rivestimento vaginale funge da barriera meccanica alla penetrazione di agenti patogeni, che possono raggiungere gli strati cellulari più profondi e diffondersi nell'organismo. La periodica desquamazione di tale epitelio favorisce la clearance di microrganismi patogeni rappresentando un ulteriore meccanismo di difesa.

La vagina, infine, contiene diversi microrganismi in equilibrio dinamico suscettibile a diverse modificazioni da parte di fattori endogeni ed esogeni quali: età, produzione di estrogeni, attività sessuale, presenza di stati patologici.

I microbioti predominanti sono rappresentati dai lactobacilli di Doderlein che comprendono *L. Acidophilus*, *L. Casei*, *L. Fermentum* ed il *L. Celloblosus*, con capacità di fermentare il glicogeno ad acido lattico; l'effetto finale è l'elevata concentrazione di idro-

genioni  $H^+$  che rende l'ambiente vaginale acido (pH fisiologico di 4 - 4.5). Gli  $H^+$  si legano all'acqua formando perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). Tale molecola è tossica per un gran numero di specie batteriche. L'azione combinata di  $H_2O_2$ , di perossidasi uterina (prodotta dalla cervice e dall'endometrio) e di ioni  $Cl^-$  e  $I^-$ , induce l'attivazione diretta dei polimorfonucleati, che esplicano un'azione battericida negli spazi intercellulari epiteliali. Alcuni ceppi di lactobacilli possono produrre una notevole quantità di molecole ad azione antimicrobica come Lactocidina, Acidolina, Acidofillina, Lactacina ed interferiscono con l'adesione batterica alle cellule epiteliali della vagina.

Il virus dell'HIV infetta nel mondo circa 40 milioni di persone. Nella maggior parte dei casi, il virus viene contratto durante i rapporti sessuali non protetti. Il rischio stimato è dello 0,1-1%. La protezione, assicurata dalla barriera della mucosa e dall'ambiente vaginale, è di circa il 99% (1,2).

La possibilità di contrarre l'infezione è variabile da soggetto a soggetto. Questa variabilità potrebbe essere attribuita ad alterazioni della risposta immunitaria vaginale innata. Numerose sono le ipotesi del meccanismo di attraversamento dell'HIV della mu-



cosa vaginale al momento dell'infezione.

L'HIV è presente nel liquido seminale di un partner affetto; con il rapporto sessuale, viene rilasciato in vagina ed attraversa la mucosa vaginale. Il virus entra in contatto con le cellule *target* dell'infezione, le cellule T CD4<sup>+</sup> attivate o le cellule dendritiche (DC) ed i macrofagi (3). Le cellule dendritiche internalizzano il virus, grazie alla presenza di specifici recettori, si attivano, maturano e migrano nella sottomucosa, raggiungendo anche i linfonodi loco regionali. Infine, processano e presentano l'antigene alle cellule T CD4<sup>+</sup>. Un'altra possibile conseguenza è che il virus resta all'interno della DC e non viene processato. Il meccanismo sembra essere associato alla capacità della cellula di bloccare l'acidificazione del compartimento endosomiale. Esiste, infine, una terza possibilità: il virus penetra ed attiva direttamente le cellule T CD4<sup>+</sup>; questo appare il meccanismo di infezione più precoce ed efficace (4).

Il virus attraversa più facilmente l'epitelio monostratificato cilindrico dell'endocervice piuttosto che quello pluristratificato dell'esocervice. L'aumento delle DC o delle cellule T CD4<sup>+</sup> a livello mucosale aumenta il rischio di infezione. Chiaramente, lo stesso si verifica in presenza di un'alterazione della continuità della mucosa vaginale.

Numerose proteine, enzimi e citochine, che concorrono alla costituzione dell'immunità vaginale, hanno effetto antivirale diretto.

La SLPI (*anti-leukoprotease Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*) impedisce l'adesione delle cellule T al virus. Essa si lega all'Annessina II, recettore presente sulla superficie dei macrofagi, bloccando il virus, dopo la fase di

fusione, ma prima della fase di trascrizione inversa del genoma virale (5). La lattoferrina interviene, invece, nei primissimi stadi di infezione, prevenendo l'*uptake* virale (6-7). La defensina agisce da ponte tra la difesa immunitaria innata e specifica, inducendo la differenziazione delle DC. L'INF $\alpha$  espresso precocemente durante l'infezione, favorisce la presentazione dell'antigene dalle DC ai linfociti T citotossici (8). La chemochina CXCL12, concentrata nello strato subepiteliale della cervice, è in grado di inibire, competitivamente, il legame del virus con uno dei suoi cofattori (CXCR4). Analogamente la  $\beta$ -chemochina, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES inibiscono il recettore CCR5 (9, 10).

L'enorme influenza di fattori, sia esogeni che endogeni, dimostrata sull'ambiente vaginale nella sua complessità, chiarisce come gli stessi fattori inducono una maggiore o minore suscettibilità all'infezione da HIV.

Aumentano la suscettibilità all'infezione da HIV:

- Variazioni nelle caratteristiche fisiche dell'epitelio vaginale, sotto l'influenza degli ormoni ovarici; in particolare, la somministrazione esogena o le alte concentrazioni di progesterone in fase luteale.
- Modificazione della costituzione del muco cervicale, indotta dall'assunzione di Contraccettivi Ormonali, che aumentano l'espressione del recettore CCR5 sulla superficie delle cellule T CD4<sup>+</sup>.
- Interruzione della continuità dell'epitelio vaginale, in presenza di ulcerazioni da HSV2 o da sifilide, in caso di uso di microbicidi, sostanze chimiche/detergenti come il nonoxinol-9, o in seguito a lesioni traumatiche.
- Alterazione del pH acido vaginale

in presenza di vaginosi batteriche, correlate alla riduzione della colonizzazione dei lactobacilli, della concentrazione di SLPI e della defensina. I lactobacilli vaginali creano un ambiente inospitale per la colonizzazione di altre specie batteriche, determinando una riduzione del rischio di STI e quindi di infezione da HIV. La produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha effetto virocidico diretto nei confronti del virus. L'uso di antibiotici e lavaggi vaginali frequenti rappresentano fattori favorevoli all'alterazione della microflora vaginale (11,12).

- Le malattie sessualmente trasmesse (STI) portano al reclutamento ed all'attivazione delle cellule immunitarie, aumentando il numero di cellule target per l'HIV. L'attivazione di queste cellule induce la sintesi di citochine proinfiammatorie tra cui l'IL-1 che up-regola la proliferazione di HIV *in vitro* (13). Infezioni a carico del tratto genitale aumentano, quindi, anche il rischio di trasmissione dell'infezione da HIV, determinando un incremento della concentrazione del virus nell'ambiente vaginale.

## Candida

Le infezioni da *Candida* costituiscono la seconda causa di vaginiti in donne in età fertile. La colonizzazione dell'ambiente vaginale da *Candida Albicans* è molto frequente, tanto da essere considerato un abitante normale della flora vaginale. La *Candida* è un fungo dimorfico. Il fenotipo caratteristico delle fasi di estensione, disseminazione e colonizzazione asintomatico è la blastospora il cui rilievo è frequente nelle secrezioni vaginali di donne sane. Il secondo fenotipo è la forma miceliale, capace di invadere



i tessuti e di dare origine alla candidosi vaginale.

Sono ancora poco chiari i meccanismi di difesa dell'ospite in corso di infezione. La flora microbica vaginale, grazie alla presenza dei lattobacilli, agisce attraverso i classici meccanismi di competizione per i nutrienti, produzione di enzimi ad attività battericida e blocco dell'adesività fungina. L'immunità umorale ha un certo ruolo nella difesa dall'infezione. In caso di immunodepressione o di vaginiti da *Candida* recidivanti, esiste una ridotta produzione di immunoglobuline secretorie. Anticorpi IgA specifici contro la *Candida* potrebbero avere un ruolo protettivo potenziale in corso di infezione ma questi non risultano in concentrazioni sufficienti (14, 15). Infine, la sintesi di INF $\gamma$  da parte dei linfociti sembra prevenire la germinazione miceliale e la sua produzione è ridotta in corso di infezione. Il ruolo dell'immunità cellulo-mediata è comunque limitato.

In effetti, il meccanismo più efficace di difesa è rappresentato proprio dall'immunità innata. È stato dimostrato, in vitro, che l'epitelio vaginale è in grado di inibire la crescita di *C. Albicans*. Purtroppo, tale difesa può essere facilmente superata in presenza di un alto numero di microrganismi (16).

In ogni caso, la presenza di disfunzione o deficit del sistema immunitario vaginale, non necessariamente sistemico, è tipico delle pazienti con forme cronico-recidivanti. Da ciò deriva la dimostrazione che donne HIV positive sono maggiormente a rischio di infezione. In realtà è stato anche dimostrato che, non tanto donne HIV positive, quanto, piuttosto, donne ad aumentato rischio di contrarre infe-

zione da HIV, siano soggette più frequentemente a candidosi vaginale (17,18).

La *C. Albicans* è la specie fungina più frequentemente correlata alla colonizzazione delle superfici mucose (orali, esofagee e vaginali) in pazienti HIV positivi. Studi clinici hanno dimostrato che soggetti suscettibili a candidiasi orofaringea sono meno colpiti da candidosi vaginali e viceversa (19). Tale variabilità sembra essere associata alle condizioni dell'ospite nonché alla capacità del fungo di adattarsi e di infettare diverse nicchie corporee. Tale capacità dipende dalla espressione di diversi isoenzimi della famiglia SAP. Sono enzimi con attività proteolitica che favoriscono la colonizzazione e l'invasione dei tessuti. SAP1 e SAP3 vengono espressi nelle candidosi orali, SAP2 in quelle vaginali (20, 21). Nei pazienti HIV positivi è tipica una espressione di SAP elevata. Questa induce un incremento della possibilità di colonizzazione delle mucose giustificando la maggiore incidenza di infezione in questi pazienti.

In passato si credeva che la presenza di vulvovaginiti da *Candida* fosse una manifestazione caratteristica della positività all'HIV: queste donne dovevano essere sottoposte al test. In realtà oggi, nonostante venga riconosciuta la maggiore frequenza di questa infezione nelle donne HIV positive, le manifestazioni cliniche e la disseminazione dell'infezione sono elementi simili a quelli manifesti in donne HIV negative.

L'infezione da candida è, comunque, compresa in tutte quelle condizioni che possono aumentare il rischio di trasmissione del virus dell'HIV. La presenza di candidosi vaginale è associata ad un consistente incremento

di concentrazione di HIV nel secreto vaginale.

## Vaginiti e vaginosi batteriche

La microflora vaginale delle donne in età riproduttiva è formata da una varietà di microrganismi, costituiti per la maggior parte da differenti specie di Lattobacilli. Si parla di vaginosi batterica (BV), più comune patologia vaginale tra le donne in età riproduttiva, nel momento in cui la normale flora vaginale è sostituita da un'aumentata crescita di *G. vaginalis*, batteri anaerobi e *Mycoplasma hominis*.

È stato dimostrato da numerosi studi che le BV sono associate ad un incremento della trasmissione di HIV-1, in quanto il tasso di infezioni da HIV tra le donne con BV è 2 volte superiore rispetto a quelle con normale flora vaginale.

La replicazione di HIV-1 è regolata da specifici fattori che attivano i promoter virali a livello dei long terminal repeat (LTR), determinando un aumento dell'espressione di HIV-1. Proprio recentemente, infatti, è stato isolato un fattore solubile inducente la replicazione di HIV (HIF) da campioni di lavaggio cervicovaginale di donne con BV, che agirebbe a livello delle LTR modulando l'espressione virale.

I microrganismi riscontrati, mediante colture di questi lavaggi, sono *Mycoplasma*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus constellatus*. Tra questi, la maggiore stimolazione alla replicazione virale è associata al *Mycoplasma* che indurrebbe la trascrizione virale mediante attivazione di enhancer kB e aumento dell'espressione di HIF. La Polymerase chain reaction (PCR), inoltre, mostra che il ceppo dominante nelle vaginosi batteriche associate ad aumentata re-



plicazione di HIV-1 è *M. hominis*.

In definitiva, la vaginosi batterica (BV) stimola la trascrizione e la traduzione di HIV-1 e *M. hominis* sembrerebbe essere il microrganismo responsabile della produzione di HIV-1. Ciò sarebbe alla base dell'aumentato rischio di trasmissione di HIV-1 (22).

Anche *G. vaginalis* si associa ad una aumentata incidenza della trasmissione sessuale di HIV attraverso meccanismi sia diretti che indiretti. Uno di essi è rappresentato dall'incremento del pH vaginale e dalla riduzione nel numero dei lactobacilli produttori di  $H_2O_2$ . Questo cambiamento sembra essere un fattore particolarmente favorevole nell'indurre la sopravvivenza e la replicazione dell'HIV.

Un'altra possibile ipotesi per spiegare il maggiore tasso di infezioni da HIV in donne con BV è l'aumentata replicazione virale indotta dal microrganismo stesso, come dimostrato nelle colture di monociti e cellule T.

È stato dimostrato, infatti, che cellule U1 in coltura presentano una maggiore replicazione virale, e cioè livelli di p24 più alti, in presenza di coinfezione da parte di determinati ceppi di *G. vaginalis*. Il picco massimo è stato 20 volte superiore rispetto ai livelli basali per i ceppi 4F, 1F, ATCC 14018, 411F e 26. I restanti ceppi presi in considerazione in questo studio non presentano tale capacità.

Pertanto, la capacità di indurre replicazione di HIV in cellule in coltura non è simile per tutti i ceppi. Tale variabilità suggerisce che determinate caratteristiche ceppo-specifiche siano più importanti rispetto ad altre nel facilitare la trasmissione dell'HIV. È possibile, inoltre, che tale capacità dipenda dalla presenza di altri microrganismi, prevalentemente anaerobi,

nell'ambiente vaginale o da altri fattori non ancora noti. In conclusione, l'induzione della replicazione di HIV nelle cellule U1 non è propria di tutti i ceppi di *G. vaginalis*; infatti, solo la colonizzazione da parte di alcuni di essi può aumentare il rischio di trasmissione dell'HIV, in particolare il biotipo 1 (24).

## Trichomonas Vaginalis

*Trichomonas vaginalis* è la più comune STP non virale nel mondo, con un'incidenza annuale pari a 170 milioni di casi. È stimato che più del 50% delle donne infette è asintomatica (con normale flora vaginale e pH), con circa un terzo di queste donne che sviluppano sintomi a 6 mesi. Nelle infezioni acute i sintomi includono spots emorragici sulla mucosa cervicale e vaginale e perdite giallo-verdastre. Nelle infezioni croniche, i sintomi sono attenuati ma includono prurito e dolore durante i rapporti sessuali. La tricomoniassi è, inoltre, associata a malattia infiammatoria pelvica e ad infertilità.

In base alla distribuzione mondiale di questo patogeno, i dati suggeriscono una forte correlazione epidemiologica tra infezione da *T. vaginalis* e HIV-1, sostenuta anche dal fatto che entrambi utilizzano la stessa via di trasmissione.

È possibile distinguere 3 diversi fattori che spiegherebbero l'aumentato rischio di trasmissione di HIV-1 in presenza di un'infezione da *T. vaginalis*:

- Effetti sull'integrità dell'epitelio urogenitale: *T. vaginalis* è citotossico per le cellule dell'epitelio urogenitale. Per determinare i suoi effetti sull'integrità del monostrato polarizzato delle cellule dell'epitelio urogenitale, sono state utilizzate

cellule PrEC, CerEC e HEC1A in coltura. In generale, è stato evidenziato che, dopo 4 ore dall'aggiunta del *T. vaginalis* Balt42 o JH31, l'intero monostrato risulta infetto. Dopo 18 ore, invece, è completamente distrutto da Balt42, mentre JH31 causa citotossicità in circa il 50% dei casi.

- Effetti sul passaggio dell'HIV-1 attraverso il monostrato epiteliale: *T. vaginalis* è capace di distruggere l'integrità dell'epitelio urogenitale in modo tempo- e dose-dipendente; non è stato evidenziato come *T. vaginalis* permetta il passaggio dell'HIV-1 attraverso il monostrato. Pertanto HIV-1 è stato aggiunto a livello della porzione apicale delle colture cellulari in presenza o meno di coinfezione da parte di *T. vaginalis*. I cambiamenti della resistenza del monostrato al passaggio delle particelle virali sono stati monitorati costantemente e il supernatante basolaterale è stato utilizzato per il dosaggio della p24 dell'HIV-1. Quando il monostrato è coinfectato con *T. vaginalis*, nel compartimento basolaterale i livelli di p24 aumentano già 48 ore dopo l'aggiunta di HIV-1. Gli stessi livelli sono da 4 a 4,6 volte più alti rispetto a quelli rilevati nei monostrati infettati dal solo HIV-1.
- *T. vaginalis* attiva le cellule immunitarie inducendo la replicazione di HIV-1 attraverso il pathway di TNFα: *T. vaginalis* è messo in coltura con cellule PBMCs infettate da HIV-1. La replicazione di HIV-1 viene incrementata maggiormente nelle colture contenenti *T. vaginalis* piuttosto che in quelle contenenti HIV-1 da solo. La pro-



duzione di TNF $\alpha$  indotta dal protozoo sembra essere alla base della promozione della replicazione di HIV-1 nelle cellule PBMCs. Il sovrannatante, ottenuto dalle colture cellulari PBMCs infettate da HIV-1, con o senza la coinfezione da parte di *T. vaginalis*, è utilizzato per la valutazione dei livelli di TNF $\alpha$ . Elevati livelli (da 2 a 4 volte superiori) di TNF $\alpha$  sono riscontrati nelle colture coinfezionate con

*T. vaginalis* rispetto a quelle infettate dal solo virus HIV-1. Per valutare se TNF $\alpha$  è direttamente coinvolto nell'induzione della replicazione di HIV-1, sono stati utilizzati anticorpi monoclonali neutralizzanti per bloccare l'effetto del TNF $\alpha$ . L'aggiunta degli anticorpi anti-TNF $\alpha$  blocca significativamente >50% della replicazione di HIV-1 nelle colture contenenti *T. vaginalis*, mentre nelle colture di control-

lo, infettate con il solo virus HIV-1, gli anticorpi non riducono la replicazione di HIV-1. Questo risultato indica che l'induzione della replicazione virale è correlata ai livelli di TNF $\alpha$  indotti dalla presenza del parassita.

Inoltre, *T. vaginalis* sembra essere in grado di promuovere anche la replicazione dell'HIV-1 mediante stimolazione non specifica dell'attivazione e della proliferazione cellulare (23).

## Bibliografia

- Galvin SR, Cohen MS. The role of sexually transmitted disease in HIV transmission, *Nat Rev Microbiol* 2004; 2:33.
- Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, Sewankambo NK, Serwadda D, Wabwire-Mangen F, Lutalo T, Li X, vanCott T, Quinn TC. Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet* 2001; 357:1149.
- Lederman MM, Offord RE, Hartley O. Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:371.
- Boggiano C, anh Littman D.R. HIV's vagina Travelogue. *Immunity* 2007; 145:147.
- Ma G, Greenwell-Wild T, Lei K, Jin W, Swisher J, Hardegen N, Wild CT, Wahl SM. Secretory leukocyte protease inhibitor binds to annexin II, a cofactor for macrophage HIV-1 infection. *J Exp Med* 2004; 200:1337.
- Harmsen MC, Swart PJ, de Bethune MP, Pauwels R, De Clercq E, The TH, Meijer DK. Antiviral effects of plasma and milk proteins: Lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *J Infect Dis* 1995; 172:380.
- Lee-Huang S, Huang PL, Sun Y, Huang PL, Kung HF, Blithe DL, Chen HC. Lysozyme and RNases as anti-HIV components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:2678.
- Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, Borrow P, Tough DE. Cross-priming of CD8 $^{+}$  T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* 2003; 4:1009.
- Agace WW, Amara A, Roberts AJ, Pablos JL, Thelen S, Ugucioni M, Li XY, Marsal J, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Ebert EC, Moser B, Parker CM. Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr Biol* 2000; 10:325.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. HIV-1 entry into CD4 $^{+}$  cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996; 381:667.
- McClelland RS, Ndinya-Achola JO and Baten JM. Reply to: 'Is vaginal washing associated with increased risk of HIV-1 acquisition?'. *AIDS* 2006; 20:1348-9.
- Vallor AC, Antonio MA, Hawes SE, et al. Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. *J Infect Dis* 2001; 184:1431-6.
- Fichorova RN, Tucker LD, Anderson DJ: The molecular basis of nonoxynol-9-induced vaginal inflammation and its possible relevance to human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis* 2001; 184:418.
- Polonelli L, De Bernardis F, Conti S, et al. Idiotype intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. *J Immunol* 1994; 152:3175-82.
- De Bernardis F, Bocconeri M, Adriana D, Spreghini E, Santoni G, Cassone A. Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infect Immun* 1997; 65:3399-3405.
- Paul L, Fidel Jr. Host defense against oropharyngeal and vaginal candidiasis: Site-specific differences *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 8-15.
- Fidel PL Jr, Wolf NA, Cutright JL, et al. *Candida*-specific Th1/Th2 reactivity in HIV+ women. ASM Conference on *Candida* and Candidiasis, Washington DC, 1996.
- Schuman R, Sobel JD, Ohmit S, et al. Mucosal *Candida* colonization and candidiasis in women with or at risk for Human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 1998; 27:1161-1167.
- Steele C, Fidel Jr PL. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infect Immun* 2002; 70: 577-583.
- De Bernardis F, Cassone A, Sturtevant J, Calderone R. Expression of *Candida albicans* SAP1 and SAP2 in experimental vaginitis. *Infect Immun* 1995; 63: 1887-1892.
- De Bernardis F, Arancia S, Morelli L, Hube B, Sanglard D, Schafer W, Cassone A. Evidence that members of the secretory aspartyl proteinases gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida* vaginitis. *J Infect Dis* 1999; 179:201-208.
- Al-Harthi L, Roebuck KA, Olinger GG, Landay A, Sha BE, Hashemi FB, Spear GT: Bacterial vaginosis-associated microflora isolated from the female genital tract activates HIV 1 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1999 Jul 1; 21(3):194-202
- Patricia C. Guenther, et al. *Trichomonas vaginalis*-Induced Epithelial Monolayer Disruption and Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Replication: Implications for the Sexual Transmission of HIV-1. *Infection and Immunity* July 2005, 73(7): 4155-4160
- Simoes JA, Hashemi FB et al. Human immunodeficiency virus type 1 stimulatory activity by *Gardnerella vaginalis*: relationship to biotypes and other pathogenic characteristics. *J Infect Dis*. 2001 Jul 1; 184(1):22-7.



Vol. 4, No. 2-3  
Giugno-Settembre 2009

# *il Ginecologo*

*Rivista di Ostetricia e Ginecologia*

**Ereditarietà paterna**

**Induzione del travaglio in presenza  
di condizioni sfavorevoli**

**Utilizzo del progesterone nella minaccia d'aborto**  
Applicazioni e limiti della terapia progestinica  
nelle patologie della gravidanza iniziale

**Diagnosi e trattamento chirurgico  
dell'endometriosi intestinale**

**Approccio isteroscopico alla diagnosi  
e al trattamento della sindrome di Asherman**

**Contraccettivi ormonali e rischio oncologico**



**Editrice Kurtis s.r.l.**

Via Luigi Zoja 30, 20153 Milano  
Visita il nostro sito Internet: [www.kurtis.it](http://www.kurtis.it)



# Contraccettivi ormonali e rischio oncologico

G. Bifulco, N. De Rosa, I. Morra, A. Cavallaro, G. Lavitola, C. Nappi

Dipartimento di Ginecologia, Ostetricia e Fistopatologia della Riproduzione Umana,  
Università degli Studi di Napoli Federico II

**L**a contraccezione ormonale è una metodica sicura ed efficace. La riduzione progressiva delle dosi di estrogeno somministrate e lo sviluppo di nuove molecole progestiniche ha permesso di conservare una buona efficacia riducendo l'incidenza degli effetti collaterali. È noto che gli estrogeni hanno un ruolo specifico nel controllo della crescita cellulare, nella riduzione dell'apoptosi e nella regolazione della produzione di fattori di crescita. Da ciò deriva la necessità di valutare un loro preciso ruolo nei meccanismi di cancerogenesi. Diversi e recenti studi epidemiologici hanno confermato che le associazioni contraccettive estroprogestiniche conferiscono una considerevole protezione contro il cancro dell'ovaio e dell'endometrio. Questa protezione è duratura, persistendo per oltre 15 anni dalla sospensione del trattamento. Altrettanto evidenti gli effetti positivi dei contraccettivi orali (CO) sulla riduzione del rischio sviluppare il cancro colon rettale e i linfomi non Hodgkin. In molti studi la terapia ormonale contraccettiva è stata associata a un aumento del rischio di cancro della cervice uterina. I CO agiscono da co-fattori nello sviluppo della patologia neoplastica indotta dal virus del papilloma umano. Le donne che assumono CO, o che hanno assunto CO in passato, hanno un rischio lievemente aumentato di sviluppare un cancro della mammella, rischio che si normalizza dopo dieci anni dalla sospensione del trattamento, e che risulta maggiore in donne portatrici di mutazioni in BRCA1 e BRCA2.

## INTRODUZIONE

Sin dalla loro introduzione nel 1960, la sicurezza di contraccettivi orali (CO) è stata diffusamente dibattuta. Negli ultimi anni si è assistito a una continua evoluzione della contraccezione ormonale: sono state modificate le forme farmaceutiche e quindi le modalità di somministrazione e il dosaggio, con l'obiettivo di ridurre gli effetti collaterali e migliorare l'efficacia e la compliance. Tutto ciò ha costretto il medico a un progressivo aggiornamento, allo scopo di poter fornire una guida completa e appropriata circa le numerose possibilità terapeutiche e i loro effetti sul benessere femminile. Nonostante, in letteratura, i dati riguardanti i poteri terapeutici e benefici dei CO siano consistenti, molte donne (circa il 75% negli Stati Uniti) ritengono che l'assunzione dei CO sia un rischio per la propria salute. Il 33% crede che questi causino il cancro, il 66% che possano essere dan-

nosi alla fertilità futura. Il 26-60% di donne al mondo interrompe la terapia per paura. Solo circa il 20% di donne è a conoscenza che i CO proteggono dal cancro ovarico e dal cancro endometriale e solo il 10% ed il 5% di donne, rispettivamente, sa che la terapia preserva da una gravidanza ectopica, dalla malattia infiammatoria pelvica (PID) e dalla patologia mammaria benigna (1-2).

Scopo di questa trattazione è quello di chiarire i rapporti tra i CO e il rischio di cancro. Tale fine ha incontrato nel corso degli anni notevoli difficoltà in relazione soprattutto a un'ampia serie di variabili (Tabella 1).

## CONTRACCETTIVI ORMONALI E TUMORI GINECOLOGICI

### Contraccettivi ormonali e rischio di cancro dell'ovaio

Il cancro ovarico è la prima causa di morte per cancro ginecologico nel mondo, con un tasso di sopravviven-

za a 5 anni che non supera il 40%. Numerosi studi sono stati compiuti, negli ultimi decenni, allo scopo di valutare la relazione tra il cancro ovarico epiteliale e l'uso di CO.

Per poter comprendere come i CO possano interferire sul rischio di sviluppare un cancro ovarico vanno brevemente analizzate le teorie ipotizzate nell'etiologia del cancro ovarico epiteliale.

- Teoria dell'ovulazione ininterrotta: accanto al danno e al trauma ripetuto nell'epitelio ovarico durante ogni ciclo ovulatorio, vi è un potenziale aumento di mutazioni genetiche con conseguente sviluppo di neoplasie ovariche durante i processi riparativi (3).
- Ipotesi delle gonadotropine ipofisarie: alti livelli di gonadotropine aumentano la stimolazione estrogenica che causa l'intrappolamento di cellule ovariche epiteliali all'interno di cisti con conseguente evoluzione maligna (4).



- Lungo periodo di latenza tra esposizione a un potenziale cancerogeno e comparsa di neoplasia
- Ampia variabilità nelle formulazioni utilizzate
- Durata del trattamento
- Scarsità di dati riguardanti l'utilizzo di CO in donne con età superiore ai 35 anni
- Presenza di fattori di rischio specifici

**Tabella 1**

Variabili di confondimento. CO: contraccettivi ormonali.

- Ipotesi infiammatoria: condizioni su base infiammatoria come endometriosi, PID, ipertiroidismo potrebbero indurre il cancro (4, 5).
- Ipotesi dello stroma ovarico: dopo l'ovulazione, si verifica una apoptosi fallimentare nelle cellule della granulosa e della teca, le quali, continuando a produrre ormoni steroidei, inducono l'insorgenza del cancro (4, 6).

Non vanno inoltre trascurate la familiarità e i fattori di rischio ereditari che risultano responsabili del 5-10% dei tumori maligni dell'ovaio. Infatti, mutazioni che coinvolgono i geni BRCA1 e BRCA2 determinano un incremento del rischio di cancro del 40%, nella settima decade di vita, per donne portatrici di mutazioni del gene BRCA1 e di circa il 10% in donne portatrici di mutazioni del gene BRCA2 (7). Tali geni codificano per alcune proteine coinvolte sia nella regolazione dell'attività dei recettori estrogenici, sia nell'interazione con proteine in grado di riparare i double strand break del DNA e di controllare il check-point G1-S.

I numerosi studi pubblicati hanno dimostrato un effetto protettivo dei CO verso il cancro ovarico epiteliale (8), con una riduzione del rischio globale che varia tra il 30 e il 40% e con un rischio ancora più basso per un uso prolungato per più di 5 anni. La riduzione del rischio è presente anche in quelle pazienti che hanno fatto un uso temporale limitato del farmaco ( $\leq 1$ anno) (9).

L'effetto protettivo appare prolunga-

to nel tempo tanto che persiste per oltre 15-20 anni dalla sospensione dell'assunzione (8, 9) e sembra essere presente in maniera paragonabile anche con le nuove formulazioni a basse dosi (10) (Figura 1).

Il meccanismo invocato è rappresentato dall'inibizione dell'ovulazione e dall'induzione dell'apoptosi mediata dal progesterone, tramite l'attivazione della cascata estrinseca che coinvolge l'attivazione della caspasi 8 (11).

Non va inoltre trascurato l'effetto protettivo dell'uso di CO in donne a rischio familiare o genetico di sviluppare un cancro ovarico. Infatti, l'uso continuato per 10 anni di CO in donne con storia familiare di cancro ovarico riduce il rischio a livelli inferiori o quanto meno uguali rispetto a quello osservato nelle donne senza anamnesi familiare positiva per la malattia. Inoltre, un ampio studio caso-controllo su 207 donne con mutazione di BRCA1/BRCA2 ha mostrato una significativa riduzione del rischio, particolarmente eviden-

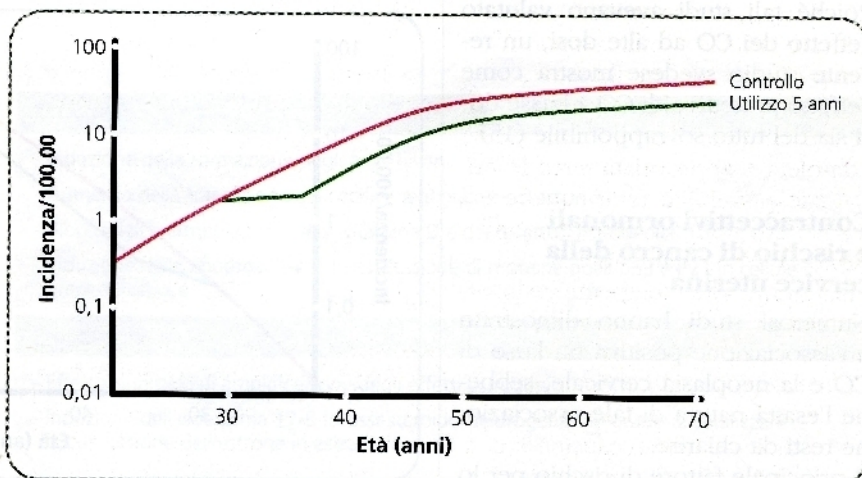
te nelle utenti per più di 6 anni (12). In definitiva, i CO possono essere considerati agenti utili per la chemioprevenzione del cancro ovarico in donne ad alto rischio come donne portatrici del fenotipo BRCA mutato. Laddove scelti come metodica contraccettiva in donne fertili consentono una notevole riduzione del rischio, essendo assunti, generalmente e secondo necessità, in particolari fasce di età (18-25 anni e 35-45 anni), assicurando una riduzione del rischio, per i loro effetti prolungati, proprio intorno ai 50-60 anni, fascia di età in cui è presente la più alta incidenza di sviluppo del cancro ovarico.

### Contraccettivi ormonali e rischio di cancro dell'endometrio

Il cancro dell'endometrio è un tumore estrogeno-dipendente che nel 90% dei casi si manifesta in postmenopausa. I suoi specifici fattori di rischio sono: l'infertilità, l'obesità, il diabete mellito, l'ipertensione e soprattutto la durata e la dose cumulata di estrogeni assunti.

**Figura 1**

Incidenza età-specifica del tumore dell'ovaio ed uso di contraccettivi orali. Modificata da: Pike MC, Spicer DV. Hormonal contraception and chemoprevention of female cancers. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7: 73-83.





Nonostante i CO contengano estrogeni, la maggior parte degli studi epidemiologici ha mostrato una riduzione del rischio nelle donne che utilizzano o hanno utilizzato i CO. Gli effetti protettivi sembrano essere associati alla componente progestinica della pillola, tanto che molti studi suggeriscono che l'effetto protettivo è maggiore con i progestinici ad alte dosi.

Il ruolo del progesterone sull'epitelio ghiandolare dell'endometrio è quello di antagonizzare la proliferazione cellulare estrogeno-dipendente (13), al contrario di quanto si verifica nel distretto mammario dove il progesterone ha effetto sia proliferativo che antiproliferativo. Gli studi degli effetti del progesterone sull'endometrio sono particolarmente rilevanti in quanto lo stesso epitelio dipende dal progesterone per la differenziazione cellulare e per contrastare la crescita incontrollata.

Si stima una riduzione del rischio del 50% in donne che hanno usato CO verso donne che non ne hanno mai fatto uso (14).

Molte informazioni derivano dal Cancer and Steroid Hormones study (CASH) (14), che mostra come l'uso di CO per un periodo inferiore a un anno non risulta avere alcun effetto protettivo. Tale effetto diviene evidente invece, per un utilizzo superiore a un anno e persiste per oltre 20 anni dalla sospensione del trattamento (Figura 2).

Poiché tali studi avevano valutato l'effetto dei CO ad alte dosi, un recente studio svedese mostra come l'effetto protettivo di CO a basse dosi sia del tutto sovrapponibile (15).

### Contraccettivi ormonali e rischio di cancro della cervice uterina

Numerosi studi hanno dimostrato un'associazione positiva tra l'uso di CO e la neoplasia cervicale, sebbene l'esatta natura di tale associazione resti da chiarire.

Il principale fattore di rischio per lo

sviluppo del carcinoma cervicale è l'infezione da virus del papilloma umano (HPV), una delle più comuni infezioni a trasmissione sessuale nelle giovani donne. Di conseguenza, l'utilizzo dei CO agirebbe come co-fattore nello sviluppo della patologia neoplastica cervicale.

In termini generali, gli estrogeni sembrano avere un importante ruolo negli stadi iniziali di infezione in quanto sono in grado di stimolare la produzione di anticorpi e la risposta cellulo-mediata. Se essi stessi abbiano un effetto protettivo o deleterio dipende dall'organismo infettante, dallo stadio di infezione. Apparentemente gli estrogeni riducono la suscettibilità all'infezione primaria da HPV ma, nel caso l'infezione sia già presente, gli estrogeni in combinazione con i progestinici faciliterebbero una progressione dell'infezione verso una condizione cancerosa (16).

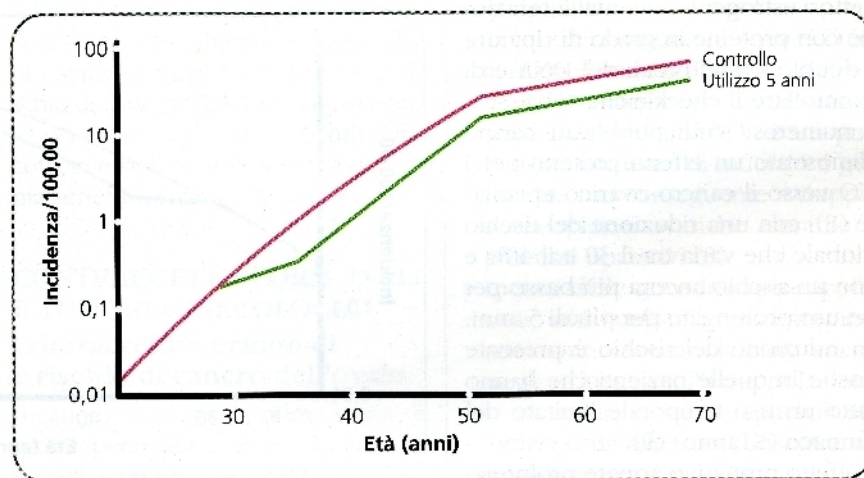
È stato riportato che i CO incrementano la trascrizione di E6 ed E7, geni coinvolti nella progressione tumorale che dall'infezione induce l'insorgenza di neoplasia cervicale intraepiteliale (CIN) e poi di cancro. I CO sembrano essere implicati nella perdita della normale attività protettiva contro il tumore correlata alla risposta immunitaria anticorpo-mediata (17). Alcuni studi epidemiologici hanno, inoltre, evidenziato un aumento della trascrizione di genotipi cancerogeni di HPV mediata dai

metaboliti idrossilati degli estrogeni così da facilitare ancora una volta la progressione dall'infezione.

I dati disponibili sono comunque controversi in considerazione soprattutto della presenza di molteplici variabili, tra cui la concomitante presenza di altre infezioni e il numero di partner sessuali che inevitabilmente creano dei bias (18), così come è verosimile che l'uso di CO limiti l'uso di altri metodi contraccettivi di barriera, protettivi verso l'infezione da HPV. Le donne utenti di CO, inoltre, più frequentemente si sottopongono a controlli periodici e all'esecuzione del Pap-Test, che consente una diagnosi precoce della lesione preneoplastica, determinando così un aumento di diagnosi durante (e non per) l'assunzione di CO. Schlesselman, in una metanalisi del 1995 (19), stima il rischio relativo di sviluppo di cancro cervicale di 1,37, 1,60, e 1,77 in donne che hanno usato CO, rispettivamente, per 4, 8, o 12 anni. Dopo la sospensione del trattamento il rischio si riduce progressivamente nel tempo. Nello stesso studio viene stimato che su 100.000 donne di età compresa tra 20 e 54 an-

**Figura 2**

Incidenza età-specifica del tumore dell'endometrio ed uso di contraccettivi orali. Modificata da: Pike MC, Spicer DV. Hormonal contraception and chemoprevention of female cancers. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7: 73-83.





ni l'utilizzo di CO per 4, 8 e 12 anni incrementa il numero di tumori della cervice/anno di 69, 125 e 178 casi.

Risulta interessante il dato per cui, se si includono nell'analisi l'attività sessuale e l'uso di metodi contraccettivi barriera, non veniva documentato alcun aumento del rischio durante l'uso di CO (20).

Una più recente metanalisi ha nuovamente confermato che l'uso corrente o recente di CO induce un aumento del rischio di sviluppare un cancro invasivo della cervice; tale rischio aumenta all'aumentare del periodo di somministrazione. L'uso per più di 5 anni è infatti associato a un rischio raddoppiato che si annulla dopo 10 anni o più dalla sospensione. Il rischio è ulteriormente aumentato se l'inizio della terapia contraccettiva si verifica in età avanzata (21).

## CONTRACCETTIVI ORMONALI E ALTRI TUMORI

### Contraccettivi ormonali e rischio di cancro della mammella

Sebbene durante gli ultimi decenni siano stati pubblicati numerosi dati epidemiologici circa la possibile associazione tra l'assunzione di CO e il cancro della mammella, la questione resta tuttora aperta.

Le molteplici evidenze circa l'aumento della percentuale di cellule in divisione nella mammella, mediata dal progesterone e indotta dagli estrogeni (22), motivarono un certo interesse circa la possibilità che le combinazioni estro-progestiniche potessero non essere protettive verso il cancro della mammella come lo sono per il cancro dell'ovaio e dell'endometrio. Fu infatti ipotizzato che l'uso dei CO subito dopo il menarca e in perimenopausa potesse essere associato a un aumento del rischio di carcinoma mammario in grado di mantenere elevati livelli di estrogeni e di progesterone.

La maggior parte dei tumori mammari è estrogeno-dipendente e numero-

si trial hanno dimostrato un aumento nella sopravvivenza in donne con patologie ormono-sensibili a seguito di trattamenti volti a ridurre la sintesi o l'attività di estrogeni endogeni (23). Questi dati, sommati con le evidenze che un menarca precoce e una menopausa tardiva sono fattori di rischio noti per il carcinoma mammario, sostengono l'ipotesi che l'esposizione a estrogeni esogeni possa incrementare il rischio e la mortalità del cancro mammario positivo per i recettori estrogenici.

Al fine di chiarire queste correlazioni più di 50 studi epidemiologici sono stati condotti nel mondo, con risultati talvolta contrastanti.

Lo studio CASII, eseguito su 4.711 donne con diagnosi recente di neoplasia mammaria e su 4.676 controlli, non ha evidenziato alcun aumento del rischio associato all'uso di CO (24). Negli stessi anni, invece, lo UK National Case Control Study Group documenta un aumento del rischio in quelle donne che avevano assunto CO e la cui diagnosi era stata posta prima dei 36 anni (25).

Allo scopo di porre fine a tali controversie il Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, nel 1996, ha rianalizzato 54 studi caso-controllo condotti in 25 paesi differenti e comprendenti 53.297 pazienti con cancro della mammella e 100.239 controlli (26). Tale revisione ha mostrato che in donne di età inferiore ai 35 anni:

- l'uso recente (da 1 a 4 anni precedenti l'analisi) piuttosto che la durata del trattamento sono maggiormente predittivi del rischio di cancro mammario e associati a un rischio maggiore (rischio relativo: 1,16);
- il rischio in caso di uso corrente è maggiore del 24% rispetto a condizioni di non assunzione;
- donne che hanno sospeso l'assunzione di CO da 5-9 anni hanno un rischio di poco superiore ai controlli (rischio relativo: 1,07);
- nessun incremento del rischio è dimostrato in donne che hanno sospeso il trattamento da 10 anni;
- l'effetto dell'assunzione corrente o recente di CO è maggiore in donne che hanno iniziato la terapia prima dei 20 anni di età;
- nelle utenti di CO la diagnosi viene posta in uno stadio meno avanzato.

Dati più recenti provengono dallo studio Women's Contraceptives and Reproductive Experiences (Women's CARE) (27), che ha evidenziato l'assenza di rischio aumentato in relazione alla durata del trattamento, all'età della prima somministrazione e all'intervallo di sospensione; il rischio non varia con i diversi dosaggi di estrogeni ed è analogo in

**Tabella 2**

Meccanismi di protezione di estrogeni e progestinici nel tumore del colon-retto.

#### Estrogeni

- Riduzione della formazione degli acidi biliari
- Aumento della trascrizione di specifici geni oncosoppressori
- Blocco dell'ipermetilazione della vitamina D e dei recettori estrogenici
- Induzione della apoptosi tramite l'espressione di proteine quali p53 e p21 in cellule preneoplastiche

#### Progestinici

- Effetto sinergico di amplificazione degli effetti estrogenici
- Induzione dell'isoenzima 17- $\beta$ -idrossi-steroido-deidrogenasi in grado di catalizzare la conversione dell'estrone in estradiolo



donne giovani (35-44 anni) e in donne più adulte (45-64 anni). Lo studio conclude che non vi è alcuna relazione tra l'assunzione di CO e il rischio di cancro mammario.

È noto che mutazioni germinali nei geni BRCA1 e BRCA2 conferiscono un sostanziale aumento nel rischio di sviluppare tumore mammario. Il rischio in tali donne viene ridotto in seguito alla soppressione della funzione ovarica mediante ovariectomia o terapia con analoghi dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH). Ciò suggerisce che gli ormoni endogeni giocano un ruolo essenziale nell'eziologia del cancro mammario in donne portatrici della mutazione (28). Oggetto di dibattito è la possibilità che la terapia ormonale contraccettiva possa ulteriormente incrementare il rischio di cancro in questo subset di donne. Narod e coll. (29) hanno dimostrato un modesto incremento del rischio in donne con mutazione in BRCA1 per ogni tipo di CO usato.

Nel 2007, Brohet e coll. (30), in un ampio studio retrospettivo, hanno stimato un incremento del rischio in donne portatrici di mutazioni in BRCA1/2 per ogni formulazione contraccettiva, soprattutto se l'assunzione risultava prolungata nel tempo e precedente alla prima gravidanza a termine. Questo effetto sembrava essere maggiore in portatrici della mutazione per BRCA2.

### **Contraccettivi ormonali e rischio di cancro colonrettale**

Fin dagli anni '60, fattori ormonali tra cui multiparità, giovane età alla prima gravidanza, e ormoni sessuali sono stati implicati nell'eziologia del cancro del colon-retto. Inoltre molti Autori hanno identificato fattori eziologici comuni tra tumore del colon-retto e tumori della sfera genitale.

In un'ampia e recente metanalisi, viene dimostrato che il rischio relativo di tumore del colon-retto in donne utenti di CO è di 0,82 e che

tale protezione è ancora più evidente in quelle donne che ne avevano fatto uso nei 10 anni precedenti (rischio relativo: 0,46) (31).

Inoltre un recentissimo studio canadese documenta che la stessa entità di protezione è presente anche in donne con storia familiare di tumore del colon-retto (32).

I meccanismi invocati per chiarire l'influenza e gli effetti degli estrogeni e dei progestinici sul colon vengono riportati nella *Tabella 1*.

### **Contraccettivi ormonali e rischio di melanoma**

Negli ultimi 10 anni l'incidenza del melanoma è notevolmente aumentata nella popolazione caucasica, con un incremento percentuale del 3-7%. Il melanoma è influenzato nel suo sviluppo da fattori ambientali e genetici, tanto che la sola esposizione solare non è sufficiente a spiegare le differenze prognostiche e di localizzazione tra maschi e femmine.

Negli Stati Uniti l'incidenza di melanoma è maggiore nelle donne dalla prima alla quarta decade di vita e circa un terzo di questi tumori si sviluppa in questa fascia di età. Inoltre, il melanoma può essere considerato il tumore a più frequente sviluppo durante la gravidanza.

I dati epidemiologici presenti in letteratura sono piuttosto controversi. Infatti, dati derivanti dall'analisi su 252 donne in premenopausa nel Nurses' Health Study II hanno evidenziato che l'uso corrente di CO aumenta di due volte il rischio di sviluppare il tumore, e questo rischio è di 3,4 volte maggiore in donne che assumono CO per più di 10 anni (33).

Più recentemente è stato dimostrato che l'assunzione di CO non modifica in maniera significativa il rischio di melanoma e che, non avendo alcun effetto sulla progressione della malattia, i CO possono essere utilizzati anche in donne già trattate adeguatamente per melanoma (34).

### **Contraccettivi ormonali e rischio di linfomi non Hodgkin**

I linfomi non Hodgkin (LNH) comprendono un complesso ed eterogeneo gruppo di linfomi. Tra essi vanno distinte forme indolenti, come il linfoma follicolare, e forme particolarmente aggressive, come il linfoma a grandi cellule diffuso (DLCL).

Recentemente Lee e coll. hanno indagato le possibili relazioni tra fattori ormonali (ciclo mestruale, gravidanza, CO, e terapia ormonale sostitutiva) e lo sviluppo del linfoma follicolare e del DLCL. Gli Autori concludono che le anomalie del ciclo mestruale, l'età precoce del menarca e la gravidanza non rappresentano fattori di rischio per lo sviluppo di LNH. L'uso di CO sembra inoltre ridurre in maniera significativa il rischio di LNH (sia di DLCL che di linfoma follicolare) (35).

Il meccanismo d'azione proposto coinvolge le profonde modificazioni che la somministrazione di ormoni esogeni induce sul sistema immunitario. Queste possono così essere riassunte:

- modulazione della risposta cellulo-mediata (Th1) e anticorpo-dipendente (Th2);
- modulazione della produzione di citochine: la terapia ormonale previene l'incremento di interleuchina-10 (IL-10), citochina coinvolta nella patogenesi dei LNH, agendo da fattore di crescita autocrino per i linfociti B (36); l'estradiolo a sua volta riduce l'IL-6, altro potente fattore di crescita nel DLCL;
- blocco della linfopoiesi e riduzione della sopravvivenza di cellule appartenenti alla linea linfoide B, al contrario di quanto determina l'ovariectomia (37);
- riduzione della differenziazione e della proliferazione di linfociti B, i cui precursori sono particolarmente sensibili agli ormoni sessuali (38);
- blocco della linfoma-genesi dovuta all'alterazione della circolazione dei linfociti, in particolare i linfociti B, e della loro proporzio-



ne, con un riequilibrio del rapporto Th1/Th2 (39);

- effetto bifasico degli estrogeni: a basse dosi possono stimolare la risposta cellulare, ad alte dosi, come in gravidanza, possono inibire l'attività del sistema immunitario (40).

## BIBLIOGRAFIA

1. Peipert JF, Gutmann J. Oral contraceptive risk assessment: a survey of 247 educated women. *Obstet Gynecol* 1993; 82: 112-117.
2. Tessler SL, Peipert JF. Perceptions of contraceptive effectiveness and health effects of oral contraception. *Womens Health Issues* 1997; 7: 400-406.
3. Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971; 2: 163.
4. Hanna L, Adams M. Prevention of ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2006; 20: 339-362.
5. Ness RB, Grisso JA, Vergona R et al. Oral contraceptives, other methods of contraception, and risk reduction for ovarian cancer. *Epidemiology* 2001; 12: 307-312.
6. Titus-Ernstoff L, Perez K, Cramer DW et al. Menstrual and reproductive factors in relation to ovarian cancer risk. *Br J Cancer* 2001; 84: 714-721.
7. Lakhani SR, Manek S, Penault-Llorca F et al. Pathology of ovarian cancers in BRCA1 and BRCA2 carriers. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2473-2481.
8. Lurie G, Thompson P, McDuffie KE et al. Association of estrogen and progestin potency of oral contraceptives with ovarian carcinoma risk. *Obstet Gynecol* 2007; 109: 597-607.
9. Bosetti C, Negri E, Trichopoulos D et al. Long-term effects of oral contraceptives on ovarian cancer risk. *Int J Cancer* 2002; 102: 262-265.
10. Ness RB, Grisso JA, Klapper J et al. Risk of ovarian cancer in relation to estrogen and progestin dose and use characteristics of oral contraceptives. *SHARE Study Group. Steroid Hormones and Reproductions. Am J Epidemiol* 2000; 152: 233-241.
11. Syed V, Ho SM. Progesterone-induced apoptosis in immortalized normal and malignant human ovarian surface epithelial cells involves enhanced expression of FasL. *Oncogene* 2003; 22: 6883-6890.
12. Narod SA, Risch H, Moslehi R et al. Oral contraceptives and the risk of hereditary ovarian cancer. *Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group. N Engl J Med* 1998; 339: 424-428.
13. Clarke CL, Sutherland RL. Progestin regulation of cellular proliferation. *Endocr Rev* 1990; 11: 266-301.
14. Combination oral contraceptive use and the risk of endometrial cancer. The Cancer and Steroid Hormone Study of the Centers for Disease Control and the National Institute of Child Health and Human Development. *JAMA* 1987; 257: 796-800.
15. Weiderpass E, Adami HO, Baron JA et al. Use of oral contraceptives and endometrial cancer risk. *Cancer Causes Control* 1999; 10: 277-284.
16. Brabin L. Interactions of the female hormonal environment, susceptibility to viral infections, and disease progression. *AIDS Patient Care STDS* 2002; 16: 211-221.
17. Matsumoto K, Yasugi T, Oki A et al. IgG antibodies to HPV16, 52, 58 and 6 L1-capsids and spontaneous regression of cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Lett* 2006; 231: 309-313.
18. Piper JM. Oral contraceptives and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1985; 22: 1-14.
19. Schlesselman J. Net effect of oral contraceptive use on the risk of cancer in women in the United States. *Obstet Gynecol* 1995; 167: 1165-1169.
20. Baird DT, Glasier AF. Hormonal contraception. *N Engl J Med* 1993; 328: 1543-1549.
21. Appleby P, Beral V, Berrington de González A et al; International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet* 2007; 370: 1609-1621.
22. Key TJ, Pike MC. The dose-effect relationship between 'unopposed' oestrogens and endometrial mitotic rate: its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk. *Br J Cancer* 1988; 57: 205-212.
23. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998; 351: 1451-1467.
24. Oral-contraceptive use and the risk of breast cancer. The Cancer and Steroid Hormone Study of the Centers for Disease Control and the National Institute of Child Health and Human Development. *N Engl J Med* 1986; 315: 405-411.
25. Oral contraceptive use and breast cancer risk in young women. UK National Case-Control Study Group. *Lancet* 1989; 1: 973-982.
26. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* 1996; 347: 1713-1727.
27. Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 346: 2025-2032.
28. Kauff ND, Satagopan JM, Robson ME et al. Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* 2002; 346: 1609-1615.
29. Narod SA, Dubé MP, Klijn J et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1773-1779.
30. Brohet RM, Goldgar DE, Easton DF et al. Oral contraceptives and breast cancer risk in the international BRCA1/2 carrier cohort study: a report from EMBRACE, GENEPSO, GEO-HEBON, and the IBCCS Collaborating Group. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3831-3836.
31. Fernandez E, La Vecchia C, Balducci A et al. Oral contraceptives and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2001; 84: 722-727.
32. Campbell PT, Newcomb P, Gallinger S et al. Exogenous hormones and colorectal cancer risk in Canada: associations stratified by clinically defined familial risk of cancer. *Cancer Causes Control* 2007; 18: 723-733.
33. Feskanich D, Hunter DJ, Willett WC et al. Oral contraceptive use and risk of melanoma in premenopausal women. *Br J Cancer* 1999; 81: 918-923.
34. Jatoi I, Gore ME. Sex, pregnancy, hormones, and melanoma. *BMI* 1993; 307: 2-3.
35. Lee JS, Bracci PM, Holly EA. Non-Hodgkin lymphoma in women: reproductive factors and exogenous hormone use. *Am J Epidemiol* 2008; 168: 278-288.
36. Nelson RA, Levine AM, Bernstein L. Reproductive factors and risk of intermediate- or high-grade B-cell non-Hodgkin's lymphoma in women. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1381-1387.
37. Kincaid PW, Medina KL, Smithson G. Sex hormones as negative regulators of lymphopoiesis. *Immunol Rev* 1994; 137: 119-134.
38. Kincaid PW, Medina KL, Payne KJ et al. Early B-lymphocyte precursors and their regulation by sex steroids. *Immunol Rev* 2000; 175: 128-137.
39. Stopińska-Głuszak U, Waligóra J, Grzela T et al. Effect of estrogen/progesterone hormone replacement therapy on natural killer cell cytotoxicity and immunoregulatory cytokine release by peripheral blood mononuclear cells of postmenopausal women. *J Reprod Immunol* 2006; 69: 65-75.
40. Luppi P. How immune mechanisms are affected by pregnancy. *Vaccine* 2003; 21: 3352-3357.

## **Infezione genitale da HPV: dimensioni del problema e diagnosi**

Il Papillomavirus umano (HPV) è responsabile della più frequente infezione virale sessualmente trasmessa e colpisce circa l'80% della popolazione sessualmente attiva. La maggiorparte delle infezioni da HPV decorre in modo subclinico ed asintomatica, pertanto la reale incidenza è sottostimata. Volendoci attenere ai dati oggi riconosciuti, circa il 16% della popolazione mondiale è portatrice dell'HPV, con un'incidenza annua di 900 mila casi. Attualmente sono 269 milioni le donne affette, e 2 miliardi sono le donne a rischio.

Un'infezione da HPV può rimanere latente per molti anni. Il 70% regredisce dopo un anno, laddove il sistema immunitario dell'ospite viene a contatto con l'antigene virale. Tuttavia una infezione genitale da HPV può anche persistere per tutta la vita, ed una infezione latente può venire attivata e/o riattivata in caso di calo delle difese immunitarie. Le donne affette da infezione persistente da HPV ad alto rischio, sono 300 volte più soggette a sviluppare lesioni squamose intraepiteliali di alto grado della cervice uterina (H-SIL).

Sono stati identificati più di 100 tipi di HPV e di questi, circa 40 infettano il tratto genitale per il loro tropismo a livello dell'epitelio squamoso di cervice, vagina, vulva e regione perianale. I genotipi genitali dell'HPV possono essere classificati in 3 gruppi in relazione alla loro capacità oncogenica: genotipi ad alto rischio (HR) associati all'insorgenza del cancro della cervice (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68); genotipi a basso rischio (LR) associati all'insorgenza di lesioni condilomatose benigne (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89); genotipi classificati come "probabilmente cancerogeni" (26, 53, 66, 73, 82) in merito ai quali

vi sono ancora dati non conclusivi riguardo all'associazione con il cancro della cervice (11,12).

Ne consegue che lo spettro clinico di lesioni correlate all'HPV è estremamente eterogeneo spaziando da infezioni asintomatiche a condilomi genitali, da lesioni displastiche pre-cancerose fino al carcinoma invasivo della cervice (13). Gli HR-HPV sono responsabili dell'99.7% dei carcinomi della cervice uterina determinando 440 mila nuovi casi di neoplasia cervicale all'anno nel mondo.

Da quando è stata stabilita la stretta correlazione tra carcinoma della cervice ed HPV, il Papillomavirus è diventato protagonista unico di innumerevoli studi epidemiologici, clinici e di biologia molecolare. Fondamentali si sono rivelati gli studi di biologia molecolare attraverso cui sono state identificate le principali caratteristiche del virus e del suo ciclo vitale.

I Papillomavirus appartengono alla famiglia Papovaviridae. Sono privi di rivestimento esterno, hanno un capsido icosaedrico composto da 72 capsomeri e contengono un genoma a doppio filamento di DNA di circa 8000 paia di basi. L'organizzazione del genoma di tutti i Papillomavirus è simile e consiste in una regione precoce (early, E), una regione tardiva (late, L) ed una regione lunga di controllo (long-control region, LCR). Le proteine E1 ed E2 modulano la replicazione del DNA virale e regolano l'espressione genica, le proteine L1 e L2 costituiscono le proteine principali del capsido. I determinanti antigenici strutturali, tipo-specifici, sono localizzati sulla superficie del virione. Le proteine capsidiche L1 ed L2 sono necessarie per l'instaurarsi dell'infezione a livello degli strati basali dell'epitelio ma, dopo che il virione si è integrato, queste proteine non sono più accessibili al sistema

immunitario dell'ospite. Una volta dentro la cellula, le proteine E1 ed E2 iniziano e mantengono la replicazione virale (14,15).

Il potenziale oncogenico dell'HPV è correlato all'iperespressione delle oncoproteine E6 ed E7. Nelle lesioni da HPV benigne il genoma virale rimane separato da quello dell'ospite (forma episomale). Ciò permette la normale trascrizione del gene E2, i cui prodotti sopprimono la E6 e la E7. Nelle lesioni con potenziale maligno il DNA virale si integra nel genoma dell'ospite: questa integrazione determina la perdita della proteina E2 ed impedisce la soppressione di E6 ed E7. La proteina virale E6, attraverso il legame alla p53, ne induce una rapida degradazione e ne blocca l'attività apoptica. La proteina virale E7, attraverso il legame e l'inattivazione della proteina del retinoblastoma, incrementa la sintesi del DNA della cellula ospite e ne blocca la differenziazione cellulare. Pertanto, le cellule prive della funzionalità di p53 e pRb sono altamente predisposte allo sviluppo del tumore, a causa di una ridotta risposta apoptica, instabilità genomica ed aumento della proliferazione, tutti segnali di una trasformazione maligna (16,17).

Donne con positività per HPV ad alto rischio presentano un rischio 116 volte maggiore di sviluppare lesioni squamose intraepiteliali di alto grado rispetto a donne negative. Le trasformazioni preneoplastiche determinate dai genotipi virali ad alto rischio oncogeno, integrati all'interno del DNA cellulare, possono regredire, rimanere invariate o progredire verso forme tumorali invasive. Un'infezione persistente con i genotipi di HPV-HR è la condizione necessaria allo sviluppo del cervicocarcinoma (18-20).

Sfortunatamente i fattori biologici responsabili della persistenza dell'HPV ancora non sono stati codificati. Unitamente al genotipo di virus ed alla carica virale, il

fattore principale dell'evoluzione in senso maligno è legato alle difese immunitarie dell'ospite. Nei soggetti immunodepressi, in particolare negli HIV positivi, si verifica un'interazione molecolare tra HIV ed HPV che esplica un effetto additivo nel processo di induzione e progressione neoplastica dell'HPV (21).

Infine, non bisogna dimenticare che un'infezione da HPV può rimanere latente anche per molti anni.

L'infezione genitale da HPV può essere diagnosticata con la citologia, l'istologia e mediante metodiche di biologia molecolare (22).

*La citologia* non è un metodo estremamente affidabile per rilevare l'HPV per due motivi fondamentali: la presenza di coilociti (cellule epiteliali presentanti ampio alone perinucleare con frequenti bi o multinucleazioni) e discheratociti è tipica ma non specifica di infezione da HPV. Tuttavia tale reperto assume valore diagnostico se correlato ad un dato clinico. Inoltre, la citologia convenzionale, è un test poco sensibile nel riconoscimento di lesioni associate alla sola infezione da HPV (accuratezza del 15%) perché gravato da un ampio numero di falsi negativi. Numerosi studi clinici hanno imputato i casi di falsi negativi a due cause principali: errori di campionamento (per i due terzi) ed errori di lettura o interpretazione (per un terzo). I primi sono stati notevolmente abbattuti mediante l'utilizzo della *citologia su strato sottile (ThinPrep)* che consente una migliore fissazione, una più facile visualizzazione delle cellule senza sovrapposizione ed una migliore lettura per la riduzione degli elementi ematici ed infiammatori. Inoltre offre l'importante vantaggio di poter essere utilizzato anche per altri test di rilevazione del DNA virale (23). Va comunque rammentato che la citologia rappresenta un test di screening e non un metodo diagnostico pertanto la sua positività rende necessario procedere ad

approfondimenti diagnostici. Particolarmente indicata, oltre che raccomandata da tutte le società scientifiche che si occupano di patologia cervico-vaginale, è *l'analisi istologica* della lesione opportunamente identificata mediante esame colposcopico.

Se la citologia e l'istologia possono evidenziare alterazioni compatibili con l'infezione da HPV, è solo con le tecniche di biologia molecolare che si può confermare con certezza la presenza e l'eventuale attività del papillomavirus umano. I test utilizzabili oggi per la ricerca e tipizzazione del virus Papilloma sono molteplici e con caratteristiche estremamente varie di complessità, costo, applicabilità su materiale biologico, livello di automazione ed accuratezza. A grandi linee possiamo suddividerli sulla base di un approccio immunocitochimico e molecolare.

Metodo immunocitochimico: prevede l'uso di anticorpi monoclonali o policlonali in grado di reagire con antigeni presenti nel capsido virale. La metodica prevede l'utilizzo di materiale citologico fresco o fissato e l'incubazione con l'anticorpo diretto contro antigeni del capsido. La fase di rivelazione avviene con anticorpi biotilinati e specifici cromogeni e con una classica controcolorazione con ematossilina. I limiti di questa metodica sono legati ad una sensibilità non ottimale (ad esempio nei casi in cui gli antigeni del capsido non sono espressi) ed alla difficoltà di eseguire una eventuale tipizzazione.

Metodi molecolari: si basano su tecniche in grado di mettere in evidenza il DNA virale, possono fornire informazioni sulla presenza di HPV ad alto e basso rischio oncogenico e/o di uno specifico sottotipo. Diverse sono le tecniche utilizzabili e diversi sono i principi che stanno alla base della loro capacità di mettere in evidenza il virus.



*Il Southern blot* ha un'alta sensibilità ma risulta complessivamente lungo e laborioso, implica l'uso di materiale radioattivo, richiede una grande quantità di materiale e non è considerato pratico per uso clinico.

*L'ibridazione in situ* permette la diretta determinazione del DNA virale nel materiale cellulare ed ha un'elevata sensibilità, infatti offre la possibilità di poter visualizzare anche una sola cellula infetta. Il principio basilare è rappresentato dalla reazione tra una sequenza a singola elica di DNA ed una sequenza ad essa complementare, marcata con traccianti e nota come sonda o probe. E' applicabile sia su preparati istologici che citologici. Permette l'identificazione del virus anche quando questo non si replica attivamente in sede intracellulare e consente, inoltre, di mettere in evidenza i diversi sottotipi.

*La ibridizzazione in soluzione (Hybrid Capture 2)* permette di evidenziare 13 HPV ad alto rischio (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) e 5 HPV a basso rischio (6, 11, 42, 43, 44). Il principio fondamentale di tale sistema è che il DNA di HPV, se presente, si combina con specifici probes a RNA creando degli ibridi molto stabili che vengono rilevati mediante chemiluminescenza. L'HC2 non individua però il singolo tipo virale e la carica virale è calcolata in forma semiquantitativa (tramite un gradiente di intensità di chemiluminescenza). Offre un'eccellente sensibilità e specificità e risultati altamente riproducibili, ha infatti ricevuto l'approvazione della FDA.

*Amplificazione genica (PCR).* La PCR (Polimerase Chain Reaction) è un'amplificazione enzimatica in vitro di una definita sequenza di DNA e pertanto, risulta altamente sensibile e specifico. Il test con PCR si è ultimamente reso disponibile in Italia con tre metodiche. Due di queste identificano i 13 principali

genotipi di HPV ad alto rischio e sono il *DuoPap*, capace di individuare il singolo tipo virale e l'*Amplicor* che non riconosce invece il singolo sottotipo. Recentemente è stato attivato anche un nuovo metodo, il *Linear Array HPV test* che identifica ben 37 genotipi di HPV ad alto e basso rischio, anche individualmente.

Tutti i test finora menzionati consentono l'esclusiva rilevazione della sola presenza del DNA virale ma non esprimono l'eventuale attività del virus. Tale caratteristica è appannaggio di quelle tecniche di biologia molecolare capaci di identificare i prodotti dell'espressione genica del virus.

*Il PreTect HPV-Proofer* determina l'attività oncogenica dei genotipi 16, 18, 31, 33 e 45 rilevando l'mRNA delle regioni oncogeniche E6/E7 dell'HPV. Include un set di primer specifici e sonde per l'identificazione e la tipizzazione dei genotipi.

*Il CINtec p16 Kit Citologico* consente la rilevazione della proteina p16 (16). Questa è una proteina che interviene nel controllo del ciclo cellulare e che viene iperespressa in cellule cervicali trasformate dagli HPV ad alto rischio. L'espressione del gene E7 nelle cellule epiteliali in replicazione comporta, infatti, l'inattivazione funzionale del pRb che induce una overespressione dell'inibitore chinasi p16 ciclina-dipendente in maniera indipendente dal tipo di HPV ad alto rischio. Nelle cellule normali infatti la p16 non è determinabile con metodiche immunoistochimiche.

Le tecniche molecolari possono essere oggi eseguite su campioni biologici con caratteristiche diverse. Partendo dal classico prelievo citologico eseguito con spatola di Ayre e Cytobrush si può ottenere:

1. Pap test convenzionale (il materiale viene direttamente strisciato su un vetrino). Su questo materiale è possibile eseguire metodiche di

amplificazione genica dopo opportuna estrazione del DNA. E' da sottolineare che la PCR può essere effettuata anche su Pap test colorati e su campioni istologici paraffinati e colorati.

2. Pap test in strato sottile (il materiale viene depositato in un vial e successivamente depositato su un vetrino con tecniche di filtrazione o sedimentazione). Su questo materiale è possibile effettuare metodiche di amplificazione genica dopo estrazione del DNA o HC2 dopo opportuna fase di conversione.

Ad oggi l'impiego delle tecniche molecolari per la rilevazione dell'HPV è stato consigliato dalle Società Scientifiche

- in associazione al Pap test per le donne dopo i 30 anni;
- nella gestione dei risultati citologici dubbi (ASCUS);
- nel follow-up delle lesioni squamose intraepiteliali di basso e medio grado (CIN1-2), per predirne la regressione, la persistenza o la progressione;
- nel follow-up di pazienti trattate per lesioni di alto grado.

Un impiego come test di screening primario richiede chiaramente l'utilizzo di procedure estremamente automatizzate, ripetibili e ben standardizzate.

Mentre l'HC2 si presta già oggi ad un utilizzo su ampi numeri, le tecniche di amplificazione genica stanno entrando in una fase di maggiore standardizzazione ed automazione, specialmente per la fase di rilevazione. Questo potrà permettere l'esecuzione rapida di ampi volumi di test.

La standardizzazione dei metodi e l'applicazione di controlli di qualità è un prerequisito indispensabile se il test HPV deve essere integrato alla pratica clinica.

Tali controlli sono necessari se si vuole arrivare ad una interpretazione certa dei risultati e per evitare risultati falsi positivi e falsi negativi.



Vol. 3, No. 3  
Settembre 2008

# *il Ginecologo*

*Rivista di Ostetricia e Ginecologia*

**Fisiologia della vagina e fluor vaginale:  
variazioni patogenetiche nel corso della vita riproduttiva**

**Screening molecolare della pre-eclampsia**

**Il ginecologo e i disturbi della differenziazione sessuale**

**Menopausa precoce: inquadramento clinico  
e management terapeutico**

**Diagnostica dell'HPV**

**Tumori borderline dell'ovaio**

**Trattamento non chirurgico dei fibromi uterini:  
l'embolizzazione arteriosa**



**Editrice Kurtis s.r.l.**

Via Luigi Zoja 30, 20153 Milano  
Visita il nostro sito Internet: [www.kurtis.it](http://www.kurtis.it)



# Diagnostica dell'HPV

G. Lavitola, G. Bifulco, R. Piccoli, C. Nappi

Dipartimento di Ginecologia, Ostetricia e Fisiopatologia della Riproduzione Umana, Università di Napoli "Federico II"

**I**l Papillomavirus umano (HPV) è responsabile della più frequente infezione virale sessualmente trasmessa e colpisce circa l'80% della popolazione sessualmente attiva. Da quando è stata stabilita la stretta correlazione tra carcinoma della cervice e HPV, il Papillomavirus è diventato protagonista unico di innumerevoli studi epidemiologici, clinici e di biologia molecolare. Fondamentali si sono rivelati gli studi di biologia molecolare attraverso cui sono state identificate le principali caratteristiche del virus e del suo ciclo vitale. L'infezione genitale da HPV, infatti, può essere diagnosticata con la citologia, l'istologia e mediante metodiche di biologia molecolare. Se la citologia e l'istologia possono evidenziare alterazioni compatibili con l'infezione da HPV, è solo con le tecniche di biologia molecolare che si possono confermare con certezza la presenza e l'eventuale attività dell'HPV. I test utilizzabili oggi per la ricerca e tipizzazione del virus Papilloma sono molteplici e con caratteristiche estremamente varie di complessità, costo, applicabilità su materiale biologico, livello di automazione e accuratezza. A grandi linee possiamo suddividerli sulla base di un approccio immunocitochimico e molecolare.

## INTRODUZIONE

Il Papillomavirus umano (HPV) è responsabile della più frequente infezione virale sessualmente trasmessa e colpisce circa l'80% della popolazione sessualmente attiva.

Sono stati identificati più di 100 tipi di HPV e di questi, circa 40 infettano il tratto genitale per il loro tropismo a livello dell'epitelio squamoso di cervice, vagina, vulva e regione perianale. I genotipi genitali dell'HPV possono essere classificati in 3 gruppi in relazione alla loro capacità oncogenica: genotipi ad alto rischio associati all'insorgenza del cancro della cervice (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68); genotipi a basso rischio associati all'insorgenza di lesioni condilomatose benigne (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89); genotipi classificati come "probabilmente cancerogeni" (26, 53, 66, 73, 82) in merito ai quali vi sono ancora dati non conclusivi riguardo all'associazione con il cancro della cervice. Ne consegue che lo spettro clinico di lesioni correlate all'HPV è estremamente eterogeneo spaziando da infezioni asintomatiche a condilomi genitali, da lesioni displastiche pre-cancerose fino al

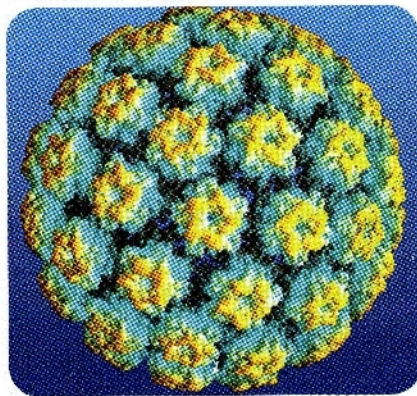
carcinoma invasivo della cervice. Gli HPV ad alto rischio sono responsabili dell'99,7% dei carcinomi della cervice uterina determinando 440.000 nuovi casi di neoplasia cervicale all'anno nel mondo.

Da quando è stata stabilita la stretta correlazione tra carcinoma della cervice e HPV, il Papillomavirus è diventato protagonista unico di innumerevoli studi epidemiologici, clinici e di biologia molecolare. Fondamentali si sono rivelati gli studi di

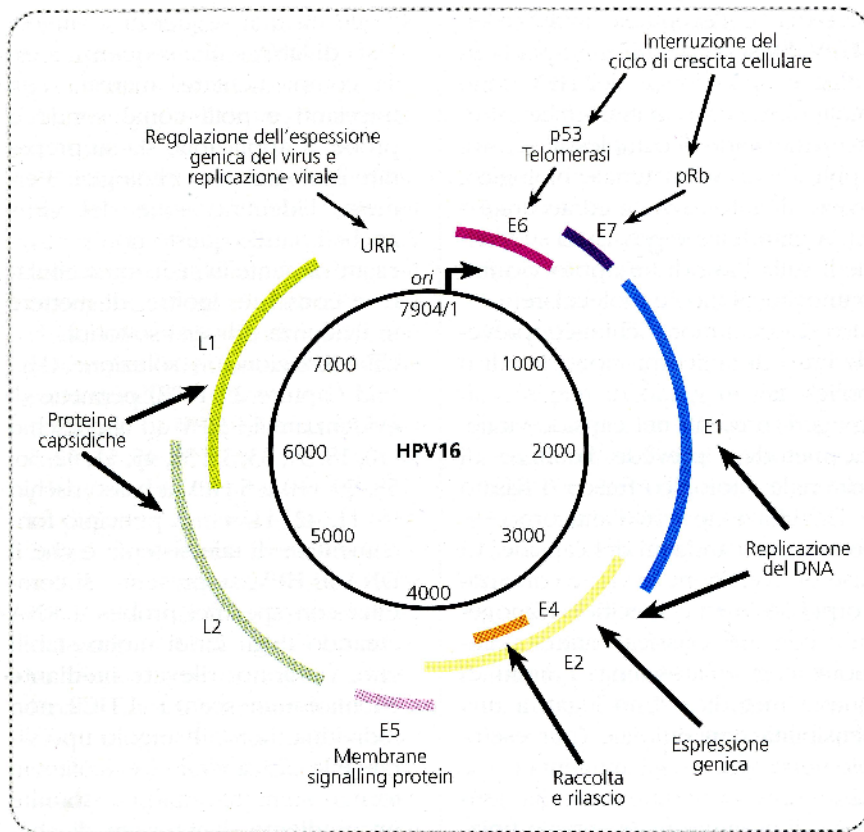
biologia molecolare attraverso cui sono state identificate le principali caratteristiche del virus e del suo ciclo vitale.

I Papillomavirus appartengono alla famiglia Papovaviridae (Figura 1). Sono privi di rivestimento esterno, hanno un capsido icosaedrico composto da 72 capsomeri e contengono un genoma a doppio filamento di DNA di circa 8.000 paia di basi. L'organizzazione del genoma di tutti i Papillomavirus è simile e consiste in una regione precoce (early, E), una regione tardiva (late, L) e una regione lunga di controllo (long-control region, LCR). Le proteine E1 ed E2 modulano la replicazione del DNA virale e regolano l'espressione genica, le proteine L1 ed L2 costituiscono le proteine principali del capsido. I determinanti antigenici strutturali, tipo-specifici, sono localizzati sulla superficie del virione. Le proteine capsidiche L1 ed L2 sono necessarie per l'instaurarsi dell'infezione a livello degli strati basali dell'epitelio ma, dopo che il virione si è integrato, queste proteine non sono più accessibili al sistema immunitario dell'ospite. Una volta dentro la cellula, le proteine E1 ed

**Figura 1**  
Modello del capsido dell'HPV.







**Figura 2**  
Organizzazione genomica dell'HPV.

E2 iniziano e mantengono la replicazione virale (Figura 2). Il potenziale oncogenico dell'HPV è correlato all'iperespressione delle oncoproteine E6 ed E7. Nelle lesioni da HPV benigne il genoma virale rimane separato da quello dell'ospite (forma episomale). Ciò permette la normale trascrizione del gene E2, i cui prodotti sopprimono la E6 e la E7. Nelle lesioni con potenziale maligno il DNA virale si integra nel genoma dell'ospite: questa integrazione determina la perdita della proteina E2 e impedisce la soppressione di E6 ed E7. La proteina virale E6, attraverso il legame alla p53, ne induce una rapida degradazione e ne blocca l'attività apoptotica. Attraverso il legame e l'inattivazione della proteina del retinoblastoma, la proteina virale E7 incrementa la sintesi del

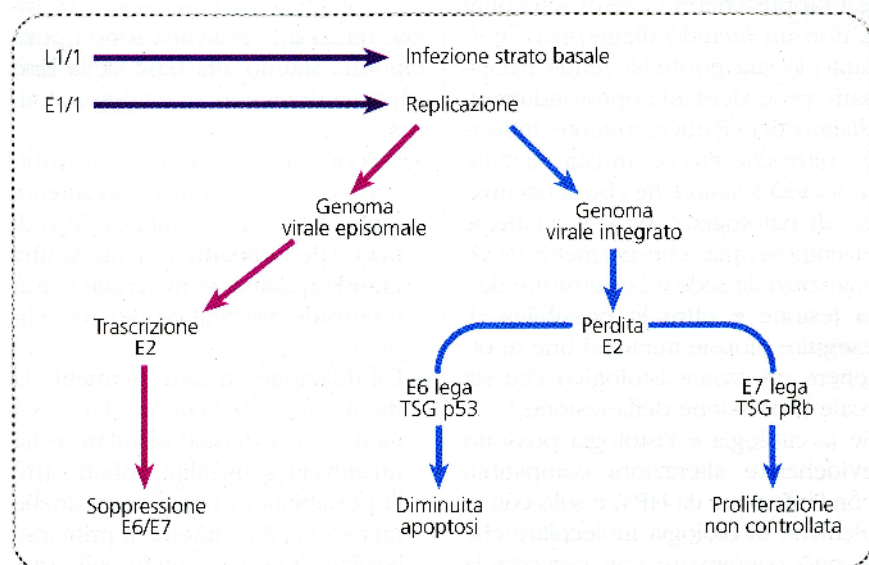
DNA e blocca la differenziazione cellulare. Le cellule prive della funzionalità di p53 e pRb sono altamente predisposte allo sviluppo del tumore, a causa di una ridotta risposta apoptotica, instabilità genomica ed aumento della proliferazione, tutti

segnali di una trasformazione maligna (Figura 3).

I genotipi virali ad alto rischio oncogeno sono responsabili della possibile integrazione all'interno del DNA cellulare, determinando modificazioni di tipo preneoplastico che possono regredire, rimanere invariate o progredire verso forme tumorali invasive. Un'infezione persistente con i genotipi di HPV ad alto rischio è la condizione necessaria allo sviluppo del cervicocarcinoma.

Sfortunatamente i fattori biologici responsabili della persistenza dell'HPV ancora non sono stati codificati. Unitamente al genotipo di virus e alla carica virale, il fattore principale dell'evoluzione in senso maligno è legato alle difese immunitarie dell'ospite. Nei soggetti immunodepressi, in particolare negli HIV positivi, si verifica un'interazione molecolare tra HIV e HPV che esplica un effetto additivo nel processo di induzione e progressione neoplastica dell'HPV. Infine, non bisogna dimenticare che un'infezione da HPV può rimanere latente per molti anni. L'infezione genitale da HPV può essere diagnosticata con la citologia,

**Figura 3**  
Azioni delle proteine virali.





l'istologia e mediante metodiche di biologia molecolare.

La citologia non è un metodo estremamente affidabile per rilevare l'HPV per due motivi fondamentali: la presenza di coilociti (cellule epiteliali presentanti ampio alone perinucleare con frequenti bi o multinucleazioni) e discheratociti è tipica ma non specifica di infezione da HPV. Tuttavia tale reperto assume valore diagnostico se correlato a un dato clinico. La citologia convenzionale, inoltre, è un test poco sensibile nel riconoscimento di lesioni associate alla sola infezione da HPV (accuratezza del 15%) perché gravato da un ampio numero di falsi negativi. Numerosi studi clinici hanno imputato i casi di falsi negativi a due cause principali: errori di campionamento (per i due terzi) ed errori di lettura o interpretazione (per un terzo). I primi sono stati notevolmente abbattuti mediante l'utilizzo della citologia su strato sottile (ThinPrep®) che consente una migliore fissazione, una più facile visualizzazione delle cellule senza sovrapposizione e una migliore lettura per la riduzione degli elementi ematici e infiammatori. Il ThinPrep® offre, inoltre, l'importante vantaggio di poter essere utilizzata anche per altri test di rilevazione del DNA virale. Va comunque rammentato che la citologia rappresenta un test di screening e non un metodo diagnostico, pertanto la sua positività rende necessario procedere ad approfondimenti diagnostici. Particolarmente indicata, oltre che raccomandata da tutte le società scientifiche che si occupano di patologia cervico-vaginale, è la colposcopia, che permette di visualizzare la sede e l'estensione della lesione e offre la possibilità di eseguire biopsie mirate al fine di ottenere un esame istologico che sia reale espressione della lesione. Se la citologia e l'istologia possono evidenziare alterazioni compatibili con l'infezione da HPV, è solo con le tecniche di biologia molecolare che si può confermare con certezza la

presenza e l'eventuale attività dell'HPV. I test utilizzabili oggi per la ricerca e tipizzazione dell'HPV sono molteplici e con caratteristiche estremamente varie di complessità, costo, applicabilità su materiale biologico, livello di automazione ed accuratezza. A grandi linee possiamo suddividerli sulla base di un approccio immunocitochimico e molecolare.

**Metodo immunocitochimico:** prevede l'uso di anticorpi monoclonali o policlonali in grado di reagire con antigeni presenti nel capsido virale. La metodica prevede l'utilizzo di materiale citologico fresco o fissato e l'incubazione con l'anticorpo diretto contro antigeni del capsido. La fase di rivelazione avviene con anticorpi biotilinati e specifici cromogeni e con una classica controcolorazione con ematossilina. I limiti di questa metodica sono legati a una sensibilità non ottimale (per esempio nei casi in cui gli antigeni del capsido non sono espressi) e alla difficoltà di eseguire un'eventuale tipizzazione.

## METODI MOLECOLARI

Si basano su tecniche in grado di mettere in evidenza il DNA virale, possono fornire informazioni sulla presenza di HPV ad alto e basso rischio oncogenico e/o di uno specifico sottotipo. Diverse sono le tecniche utilizzabili e diversi sono i principi che stanno alla base della loro capacità di mettere in evidenza il virus.

- Il Southern blot ha un'alta sensibilità ma risulta complessivamente lungo e laborioso, implica l'uso di materiale radioattivo, richiede una grande quantità di materiale e non è considerato pratico per uso clinico.
- L'ibridazione in situ permette la diretta determinazione del DNA virale nel materiale cellulare e ha un'elevata sensibilità, infatti offre la possibilità di visualizzare anche una sola cellula infetta. Il principio basilare è rappresentato dalla rea-

zione tra una sequenza a singola elica di DNA e una sequenza a es-sa complementare, marcata con traccianti e nota come sonda o probe. È applicabile sia su preparati istologici che citologici. Permette l'identificazione del virus anche quando questo non si replica attivamente in sede intracellulare e consente, inoltre, di mettere in evidenza i diversi sottotipi.

- L'ibridizzazione in soluzione (Hybrid Capture 2®, HC2) permette di evidenziare 13 HPV ad alto rischio (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) e 5 HPV a basso rischio (6, 11, 42, 43, 44). Il principio fondamentale di tale sistema è che il DNA di HPV, se presente, si combina con specifici probes a RNA creando degli ibridi molto stabili che vengono rilevati mediante chemiluminescenza. L'HC2 non individua, però, il singolo tipo virale e la carica virale è calcolata in forma semiquantitativa (tramite un gradiente di intensità di chemiluminescenza). Offre un'eccellente sensibilità e specificità e risultati altamente riproducibili, ha infatti ricevuto l'approvazione della Food and Drug Administration.
  - Amplificazione genica (PCR). La PCR (polymerase chain reaction) è un'amplificazione enzimatica in vitro di una definita sequenza di DNA e, pertanto, risulta altamente sensibile e specifica. Il test con PCR si è ultimamente reso disponibile in Italia con tre metodiche. Due di queste identificano i 13 principali genotipi di HR-HPV, e sono il DuoPap®, capace di individuare il singolo tipo virale, e l'Amplicor® che non riconosce invece il singolo sottotipo. Recentemente è stato attivato anche un nuovo metodo, il Linear Array® HPV test che identifica ben 37 genotipi di HR-HPV e LR-HPV, anche individualmente.
- Tutti i test finora menzionati consentono l'esclusiva rilevazione della sola presenza del DNA virale ma non esprimono l'eventuale attività



del virus. Tale caratteristica è appannaggio di quelle tecniche di biologia molecolare capaci di identificare i prodotti dell'espressione genica del virus.

- Il PreTect® HPV-Proofer determina l'attività oncogenica dei genotipi 16, 18, 31, 33 e 45 rilevando l'RNA messaggero (mRNA) delle regioni oncogeniche E6/E7 dell'HPV. Include un set di primer specifici e sonde per l'identificazione e la tipizzazione dei genotipi.
- Il CINtec® p16 Kit citologico consente la rilevazione della proteina p16. Questa è una proteina che interviene nel controllo del ciclo cellulare e che viene iperespressa in cellule cervicali trasformate dagli HPV ad alto rischio. L'espressione del gene E7 nelle cellule epiteliali in replicazione comporta, infatti, l'inattivazione funzionale del pRb che induce una overespressione dell'inibitore chinasi p16 ciclina-dipendente in maniera indipendente dal tipo di HPV ad alto rischio. Nelle cellule normali infatti la p16 non è determinabile con metodiche immunoistochimiche.

Le tecniche molecolari possono essere oggi eseguite su campioni biologici con caratteristiche diverse. Partendo dal classico prelievo citologico eseguito con spatola di Ayre e Cytobrush si può ottenere:

- Pap test convenzionale (il materiale viene direttamente strisciato su un vetrino). Su questo materiale è possibile eseguire metodiche di

amplificazione genica dopo opportuna estrazione del DNA. È da sottolineare che la PCR può essere effettuata anche su Pap test colorati e su campioni istologici paraffinati e colorati.

- Pap test in strato sottile (il materiale viene deposto in un vial e successivamente deposto su un vetrino con tecniche di filtrazione o sedimentazione). Su questo materiale è possibile effettuare metodiche di amplificazione genica dopo estrazione del DNA o HC2 dopo opportuna fase di conversione. A oggi l'impiego delle tecniche molecolari per la rilevazione dell'HPV è stato consigliato dalle società scientifiche:

- in associazione al Pap test per le donne dopo i 30 anni;
- nella gestione dei risultati citologici dubbi (ASCUS: atypical squamous cells of undetermined significance);
- nel follow-up delle lesioni squamose intraepiteliali di basso e medio grado (CIN1-2), per predire la regressione, la persistenza o la progressione;
- nel follow-up di pazienti trattate per lesioni di alto grado.

Un impiego come test di screening primario richiede chiaramente l'utilizzo di procedure estremamente automatizzate, ripetibili e ben standardizzate.

Mentre l'HC2 si presta già oggi a un utilizzo su ampi numeri, le tecniche di amplificazione genica stanno en-

trando in una fase di maggiore standardizzazione e automazione, specialmente per la fase di rilevazione. Questo potrà permettere l'esecuzione rapida di ampi volumi di test.

La standardizzazione dei metodi e l'applicazione di controlli di qualità è un prerequisito indispensabile se il test HPV deve essere integrato alla pratica clinica. Tali controlli sono necessari se si vuole arrivare a una interpretazione certa dei risultati e per evitare risultati falsi positivi e falsi negativi.

## BIBLIOGRAFIA

- European Society for Infectious Disease in Obstetrics and Gynaecology. Recommendations for the diagnosis and treatment of HPV infections of the female tract. European Journal for Infectious and Immunological Diseases in Obstetrics and Gynaecology 2001; 4-5 (Suppl).
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. Int J Cancer 2001; 92: 276-284.
- Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. Am J Med 1997; 102: 3-8.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 2003; 348: 518-527.
- Muñoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB et al. HPV in the etiology of human cancer. Vaccine 2006; 24 (Suppl 3): S1-S7.
- Nardo G, Vignato A, Testa B et al. Citologia in strato sottile ThinPrep 2000 versus pap test convenzionale. Nostra esperienza su 10884 casi nell'ambito dello screening organizzato di Verona. La Colposcopia in Italia-SICPCV- anno XIX, N. 2: 6-10.
- Stanley M. HPV vaccines. Rev Med Virol 2006; 16: 139-149.

## **Epidemiologia dei genotipi di HPV ad alto rischio**

Il cervicocarcinoma è causato da genotipi di HPV mucosali, filogeneticamente correlati tra loro, appartenenti alle specie alpha ad alto rischio oncogeno.

I genotipi della specie alpha che più frequentemente risultano associati al cervicocarcinoma sono HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58 (24). Essi sono stati classificati dallo IARC Monograph Working Group in base alla loro capacità di determinare lo sviluppo del cervicocarcinoma (25). Il genotipo a più alto rischio oncogeno è l'HPV 16, seguito dai genotipi 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 per i quali sussistono sufficienti evidenze riguardo alla loro correlazione con lo sviluppo del cervicocarcinoma. L'HPV 68, appartenente sempre alla specie alpha, è classificato, invece, come “probabile” agente cancerogeno poiché risultano limitate le evidenze riguardo al suo ruolo oncogenico nell'uomo. Tutti gli altri tipi di HPV specie alpha sono classificati come “possibili” agenti cancerogeni ad eccezione di HPV 6 e 11, i quali sono ritenuti “non cancerogeni” per l'uomo sulla base di evidenze epidemiologiche non sufficienti e assenza di potenziale cancerogeno evidenziato da studi molecolari (26).

Nel mondo la prevalenza dell'infezione da HPV in donne con normale citologia è approssimativamente del 10%; ciò sta ad indicare che l'HPV è una delle più comuni infezioni trasmesse per via sessuale. La prevalenza dell'HPV è più alta nei paesi in via di sviluppo (13,4%) rispetto a quella presente nei paesi industrializzati (8,4%). Le donne africane (22,1%), in particolare le donne dell'Africa orientale, presentano una più alta prevalenza dell'infezione (31,6%) a differenza delle donne del Sud-est asiatico che presentano la più bassa prevalenza (6,2%). In tutti i continenti, l'HPV 16

è il genotipo più comune con una prevalenza mondiale del 2,6%, nel Nord America del 3,5% e in Europa del 2,3%.

Dopo l'HPV 16, il secondo per prevalenza nel mondo, con particolare diffusione in Europa e in Centro-Sud America è l'HPV 18. Mentre, in Africa, il secondo genotipo più frequente è l'HPV 52 e l'HPV 18 è il terzo. In Asia, HPV 18 è solo il quarto genotipo più frequente dopo HPV 16, 52 e 58. Infine, in Nord America, HPV 18 è solo il quarto genotipo più comune dopo HPV 16, 53 e 52.

***Ranking di prevalenza dei genotipi di HPV in donne con normale citologia nei diversi continenti (10%).***

Continente	Ranking	Genotipi HPV
<b>AFRICA</b>	1 <sup>st</sup>	HPV <b>16</b>
	2 <sup>nd</sup>	HPV 52
	3 <sup>rd</sup>	HPV <b>18</b>
	4 <sup>th</sup>	HPV 58
	5 <sup>th</sup>	HPV 31
<b>ASIA</b>	1 <sup>st</sup>	HPV <b>16</b>
	2 <sup>nd</sup>	HPV 52
	3 <sup>rd</sup>	HPV 58
	4 <sup>th</sup>	HPV <b>18</b>
	5 <sup>th</sup>	HPV 56
<b>NORD AMERICA</b>	1 <sup>st</sup>	HPV <b>16</b>
	2 <sup>nd</sup>	HPV 53
	3 <sup>rd</sup>	HPV 52
	4 <sup>th</sup>	HPV <b>18</b>
	5 <sup>th</sup>	HPV 39
<b>CENTRO-SUD AMERICA</b>	1 <sup>st</sup>	HPV <b>16</b>
	2 <sup>nd</sup>	HPV <b>18</b>
	3 <sup>rd</sup>	HPV 61
	4 <sup>th</sup>	HPV 71
	5 <sup>th</sup>	HPV 58
<b>EUROPA</b>	1 <sup>st</sup>	HPV <b>16</b>
	2 <sup>nd</sup>	HPV <b>18</b>
	3 <sup>rd</sup>	HPV 31
	4 <sup>th</sup>	HPV 33
	5 <sup>th</sup>	HPV 58

La prevalenza dell'infezione da HPV in donne *con lesioni intraepiteliali squamose di alto grado (H-SIL)* è approssimativamente dell'85%. Questo è evidente soprattutto in caso di CIN III, mentre questa correlazione è meno chiara in caso di CIN II, che presenta una sostanziale variabilità sia nell'ambito della diagnosi che della prognosi. HPV 16 è il genotipo maggiormente correlato a H-SIL con una prevalenza che oscilla tra il 51,8% in Europa e il 33,3% in Oceania. La stima mondiale mostra che HPV 16 è associato nel 45,4 % a lesioni di alto grado. Nel mondo, in Europa e in Africa, HPV 31 e 33 sono i secondi e i terzi genotipi più comuni, mentre in America Latina e nei Caraibi queste posizioni spettano rispettivamente all'HPV 58 e 18; in Nord America all'HPV 6 e 18; in Asia all'HPV 58 e 52; in Oceania all'HPV 31 e 18.



**Ranking di prevalenza dei genotipi di HPV in donne con diagnosi citologica di H-SIL nei diversi continenti (85%).**

Continente	Ranking	Genotipi HPV
AFRICA	1 st	HPV 16
	2 <sup>nd</sup>	HPV 33
	3 <sup>rd</sup>	HPV 31
	4 <sup>th</sup>	HPV 18
	5 th	HPV 52
ASIA	1 st	HPV 16
	2 <sup>nd</sup>	HPV 58
	3 <sup>rd</sup>	HPV 52
	4 <sup>th</sup>	HPV 18
	5 th	HPV 33
NORD AMERICA	1 st	HPV 16
	2 <sup>nd</sup>	HPV 6 ?
	3 <sup>rd</sup>	HPV 18
	4 <sup>th</sup>	HPV 31
	5 th	HPV 58
CENTRO-SUD AMERICA	1 st	HPV 16
	2 <sup>nd</sup>	HPV 58
	3 <sup>rd</sup>	HPV 18
	4 <sup>th</sup>	HPV 31
	5 th	HPV 33
EUROPA	1 st	HPV 16
	2 nd	HPV 31
	3 rd	HPV 33
	4 th	HPV 18
	5 th	HPV 52
OCEANIA	1 st	HPV 16
	2 nd	HPV 18
	3 rd	HPV 31
	4 th	HPV 58
	5 th	HPV 33

La prevalenza dell'infezione da HPV in donne affette **da cervicocarcinoma** è pari circa al 100%. HP V 16 è il genotipo a maggiore prevalenza nel mondo seguito in ordine decrescente da HPV 18, 33, 45, 31, 58, 52 e 35. Solo in Asia il terzo, quarto e quinto posto sono occupati rispettivamente da HPV 58, 33 e 52.

L'HPV 18 è il secondo genotipo predominante in tutte le lesioni cervicali e sembra essere maggiormente correlato allo sviluppo dell'adenocarcinoma. L'adenocarcinoma comprende, infatti, circa il 16% di tutte le neoplasie della cervice

uterina e nei paesi industrializzati, dove vengono attuati programmi di screening, è riportato addirittura un aumento della sua incidenza al di sopra del 20%.

Nell'ambito del cervicocarcinoma, comunque, il primato spetta all'HPV 16 il quale contribuisce, nel 50-55% dei casi, allo sviluppo del cervicocarcinoma. Ciò sta a significare che questo genotipo virale ha un vantaggio biologico per quanto concerne la trasmissione, la persistenza e la capacità di indurre trasformazione neoplastica.

***Ranking di prevalenza dei genotipi di HPV in donne con diagnosi di cervicocarcinoma nei diversi continenti.***

Continente	Ranking	Genotipi HPV
<b>AFRICA</b>	1 <sup>st</sup>	HPV <b>16</b>
	2 <sup>nd</sup>	HPV <b>18</b>
	3 <sup>rd</sup>	HPV 33
	4 <sup>th</sup>	HPV 45
	5 <sup>th</sup>	HPV 35
<b>ASIA</b>	1 <sup>st</sup>	HPV <b>16</b>
	2 <sup>nd</sup>	HPV <b>18</b>
	3 <sup>rd</sup>	HPV 58
	4 <sup>th</sup>	HPV 33
	5 <sup>th</sup>	HPV 52
<b>NORD AMERICA</b>	1 <sup>st</sup>	HPV <b>16</b>
	2 <sup>nd</sup>	HPV <b>18</b>
	3 <sup>rd</sup>	HPV 31
	4 <sup>th</sup>	HPV 33
	5 <sup>th</sup>	HPV 45
<b>CENTRO-SUD AMERICA</b>	1 <sup>st</sup>	HPV <b>16</b>
	2 <sup>nd</sup>	HPV <b>18</b>
	3 <sup>rd</sup>	HPV 31
	4 <sup>th</sup>	HPV 45
	5 <sup>th</sup>	HPV 33
<b>EUROPA</b>	1 <sup>st</sup>	HPV <b>16</b>
	2 <sup>nd</sup>	HPV <b>18</b>
	3 <sup>rd</sup>	HPV 33
	4 <sup>th</sup>	HPV 31
	5 <sup>th</sup>	HPV 45
<b>OCEANIA</b>	1 <sup>st</sup>	HPV <b>16</b>
	2 <sup>nd</sup>	HPV <b>18</b>
	3 <sup>rd</sup>	HPV 45
	4 <sup>th</sup>	HPV 31
	5 <sup>th</sup>	HPV 35

Alla luce di questi dati, la ricerca si è concentrata, particolarmente, sui genotipi 16 e 18 allo scopo di realizzare vaccini profilattici anti HPV ed elaborare una rivoluzionaria strategia di prevenzione del cervicocarcinoma.

## **Nostra esperienza**

Nel lavoro da noi condotto è stata analizzata una complessa problematica, relativa ai genotipi di HPV bersaglio del vaccino. Le IgG di L1 non danno cross-reattività e quindi un determinato vaccino anti-HPV può fornire protezione solo verso i tipi virali inclusi. Dato che i genotipi virali oncogenici sono numerosi e la loro distribuzione è molto varia tra i diversi paesi, per ridurre l'incidenza del cancro cervicale in modo significativo, un vaccino dovrebbe comprendere almeno i tipi più comuni.

Numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato che l'HPV 16 rappresenta il genotipo ad alto rischio più diffuso tra le donne italiane. Tuttavia, sono scarsi i dati relativi ai genotipi di HPV predominanti in donne immigrate in Italia.

Obiettivo di questo studio è stato esaminare un gruppo di donne immigrate in Italia, provenienti principalmente dalla Nigeria e con una storia di prostituzione, al fine di identificare i genotipi di HPV e le loro varianti che si stanno diffondendo attraverso i flussi migratori. A tal fine sono state arruolate 45 donne immigrate in Italia e viventi attualmente in Campania, di cui 38 provenienti dalla Nigeria. Delle 45 donne, 14 sono risultate HIV-positive, con età media di 29.48 anni ( $\pm$  3.63), e 31 HIV-negative, con età media di 28.85 anni ( $\pm$  3.82). Il 55.5% (ovvero 25 delle 45 donne) si è rivelato un gruppo a rischio per storia di prostituzione. Le caratteristiche della popolazione studiata sono riportate nella tabella 1.



**Tabella 1:** caratteristiche delle pazienti

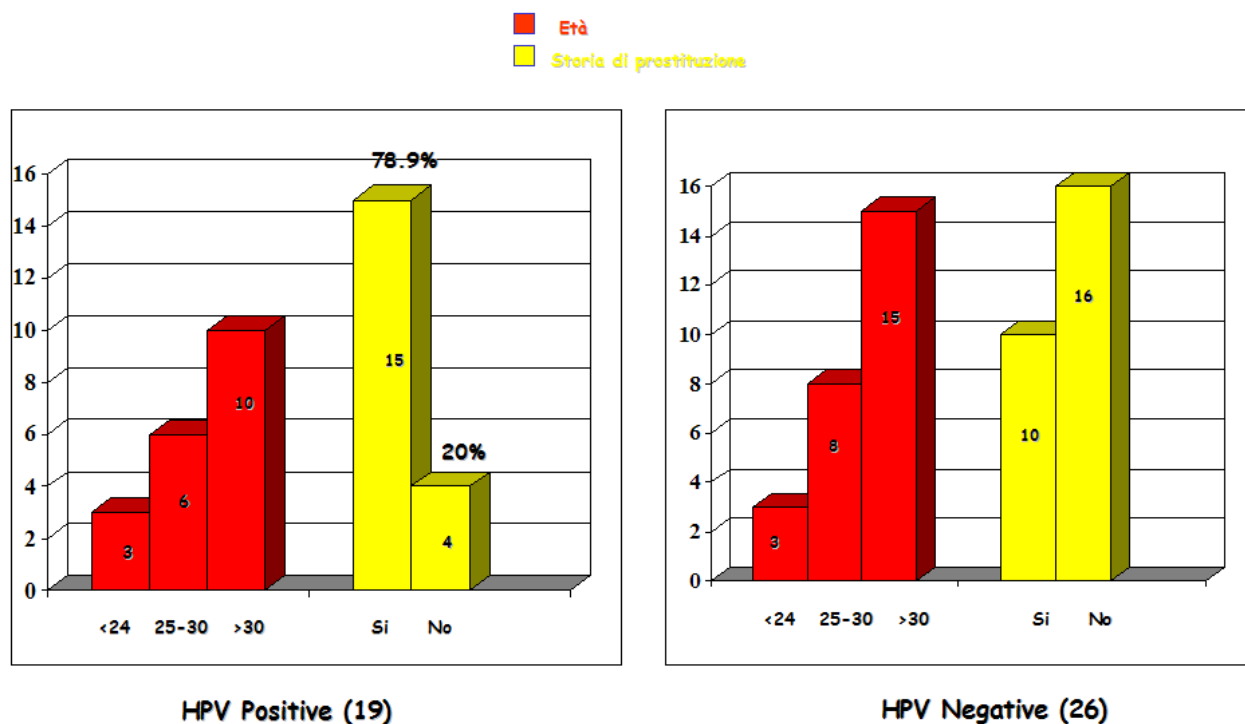
Variabili	N.ro di donne	Donne HIV positive (n=14)		Donne HIV negative (n=31)		p
		N.ro	(%)	N.ro	(%)	
Età media [Sb]	45	29.8	[ ± 3.63]	28.85	[ ±3.82]	0.3068
Età						0.5616
<24	6	3	(50.0)	3	(50.0)	
25-30	14	4	(28.5)	10	(71.4)	
>30	25	7	(28.0)	18	(72.0)	
Paese d'origine						0.0021
Nigeria	38	8	(21.0)	30	(78.9)	
Altri	7	6	(85.7)	1	(14.2)	
Storia di prostituzione						0.4283
Sì	25	9	(36.0)	16	(64.0)	
No	20	5	(25.0)	15	(75.0)	

Il Dna genomico è stato estratto dalle cellule cervicali secondo le metodiche utilizzate presso la Virologia Oncologica della Fondazione “ Pascale “, con la cui collaborazione è stato possibile effettuare questo studio (27). La ricerca del virus nelle cellule è stata effettuata con reazione di “nested PCR”, una variante della reazione di polimerizzazione a catena classica, utile in presenza di una scarsa quantità di DNA da amplificare. Il principio della reazione consiste nell’amplificazione in vitro di segmenti di DNA, utilizzando una coppia di sonde nucleotidiche (primer) complementari a sequenze poste all’estremità del segmento da amplificare. Sono stati utilizzati rispettivamente MY09/MY11 e GP5+/GP6+ come primers alle estremità esterna ed interna del segmento da amplificare (28,29). Tutti i campioni risultati positivi per HPV sono stati esaminati da un punto di vista genotipico attraverso l’analisi delle sequenze di DNA. I dati sono stati analizzati

utilizzando il test  $\chi^2$  e, quando appropriato, il test di Fisher per calcolare i valori di  $p$  relativi alle differenze tra i gruppi. Il valore di  $p$  per la significatività statistica è stato fissato a 0.05.

Le sequenze di HPV sono state amplificate nel 42.2% dei campioni con un tasso di identificazione del 57.1% (8/14) nelle HIV positive e del 35.5% (11/31) nelle HIV-negative ( $p = 0.02$ ). Quindici soggetti (78.9%) tra i 25 che riportavano di aver tenuto un comportamento sessuale a rischio sono risultati positivi per sequenza di HPV ( $p = 0.02$ ). Solo 4 (20%) delle 20 donne senza comportamento sessuale a rischio sono risultate positive per HPV (tab. 2).

I tipi maggiormente prevalenti sono risultati essere l'HPV 33, 35, 58 e 70, ad alto rischio, e 81, a basso rischio, con una frequenza del 4.4%, seguiti da HPV 54, 31, 52 e 16, in ordine di prevalenza decrescente (tab.3). Le infezioni multiceppo rappresentavano il 26.3% (5/19) delle infezioni delle donne studiate, senza differenze significative tra i soggetti HIV positivi e HIV negativi.



**Tabella 3:** Prevalenza di diversi genotipi di HPV in donne HIV-positive e HIV-negative

Genotipi HPV	Donne HIV positive (n=14)		Donne HIV negative (n=31)		Tutte le donne (n=45)	
	N.ro	(%)	N.ro	(%)	N.ro	(%)
HPV positive	8	(57.1)	11	(35.5)	19	(40.0)
HPV negative	6	(42.8)	20	(64.5)	26	(57.8)
<b>SINGOLA INFEZIONE</b>						
Tipi HPV ad alto rischio						
16	0	-	1	(3.22)	1	(2.22)
33	0	-	2	(6.45)	2	(4.44)
35	1	(7.14)	1	(3.22)	2	(4.44)
52	1	(7.14)	0	-	1	(2.22)
58	1	(7.14)	1	(3.22)	2	(4.44)
67	1	(7.14)	0	-	1	(2.22)
70	2	(14.3)	0	-	2	(4.44)
<b>Totale alto rischio</b>	<b>6</b>	<b>(42.86)</b>	<b>5</b>	<b>(16.1)</b>	<b>11</b>	<b>(24.4)</b>
Tipi HPV a basso rischio						
54	0	-	1	(3.22)	1	(2.22)
81	1	(7.14)	1	(3.22)	2	(4.44)
<b>Totale basso rischio</b>	<b>1</b>	<b>(7.14)</b>	<b>2</b>	<b>(6.45)</b>	<b>3</b>	<b>(6.7)</b>
<b>MULTIPLE INFEZIONI</b>						
Indeterminato	1	(7.14)	0	-	1	(2.22)
16 + indeterminato	0	-	1	(3.22)	1	(2.22)
31+ 58	0	-	1	(3.22)	1	(2.22)
33 + 54	0	-	1	(3.22)	1	(2.22)
70 + indeterminato	0	-	1	(3.22)	1	(2.22)
<b>Totale multiple infezioni</b>	<b>1</b>	<b>(7.14)</b>	<b>4</b>	<b>(12.9)</b>	<b>5</b>	<b>(11.1)</b>

Lo studio delle sequenze nucleotidiche delle regioni amplificate di MY09/MY11 ha portato all'identificazione di varianti dell'HPV 16, 52 e 58, non riscontrabili tra le donne europee. La tabella 4 mette a confronto le sequenze nucleotidiche del genotipo di riferimento, presenti in GeneBank, e le sequenze omologhe di 5 varianti di HPV isolate nel nostro studio. L'unico genotipo HPV16 isolato, identificato su un campione nigeriano, ha mostrato 7 mutazioni in posizione 6695 (A  $\rightarrow$  C ), 6721 (G  $\rightarrow$  A), 6853 (C  $\rightarrow$  T), 6865 (C  $\rightarrow$  T), 6970 (C  $\rightarrow$  T), 6994 (G  $\rightarrow$  A) e 7060 (G  $\rightarrow$  T), che caratterizzano il ceppo "Africano 2", precedentemente identificato su campioni isolati in Africa (30,31), ma non sulla popolazione italiana (27). La variante di HPV 52 isolata, DF-32, ottenuta da una donna dell'Uruguay, ha mostrato una mutazione precedentemente riscontrata su campioni di Panama e Brasile. Inoltre, tre HPV58 isolati, uno ottenuto da un'etiope e due da donne nigeriane, sono risultati omologhi a due distinte varianti, precedentemente isolate in Mali ed in Brasile.

Sebbene questo studio sia limitato dall'essere condotto su un numero relativamente esiguo di donne, dovuto al basso tasso di partecipazione, esso mostra chiaramente che le immigrate, portatrici di varianti virali presenti nei loro paesi d'origine, possono contribuire alla diffusione di genotipi di HPV rari tra le popolazioni autoctone.

Da queste osservazioni scaturisce che una campagna di vaccinazione a scopo profilattico esclusivamente anti HPV16 e 18 potrebbe rivelarsi parzialmente inefficace. Verosimilmente i vaccini andrebbero personalizzati in relazione all'area geografica a cui destinarli, in base ai differenti "cocktails" di genotipi di HPV presenti nella popolazione.

Occorrerebbero, numerosi studi epidemiologici, compresa la sorveglianza di tutti quei gruppi a rischio che possono costituire un serbatoio di genotipi rari e delle loro varianti, per testare l'efficacia degli attuali vaccini e permettere in futuro l'elaborazione di strategie di vaccinazione più valide.

**Tabella 4: Varianti di Papillomavirus umani tipo 16, 52 e 58 in donne immigrate**

<b>HPV 16</b>	6	6	6	6	6	6	6	6	7	<b>Classe</b>	<b>Paese di origine</b>
	6	7	8	8	8	8	9	9	0		
	9	2	0	5	6	6	7	9	6		
	5	1	3	3	2	5	0	4	0		
Referenza (NC001526)	A	G	A	C	T	C	C	G	G	E	Germania
DF-124	C	A	-	T	-	T	T	A	T	Af2	Nigeria
Z-1194	C	A	-	T	-	T	T	A	T	Af2	Zaire
<b>HPV 52</b>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	7	7	7	7	7	7	8	9	9	9	9
	0	0	1	1	6	9	2	1	2	3	4
	1	3	1	2	4	4	4	7	0	5	1
Referenza (X74481)	T	A	A	G	T	A	C	C	T	T	Italia
DF-32	-	C	G	A	-	-	-	A	G	A	G
IS464 (U45923)	-	C	G	A	-	-	-	A	G	A	G
BR0258 (DQ057320)	-	C	G	A	-	-	-	A	G	A	G
HK1151 (DQ057317)	A	-	-	-	C	G	T	A	G	A	G
<b>HPV 58</b>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7
	6	6	6	6	6	7	7	8	8	8	0
	4	8	9	9	9	1	9	2	2	2	1
	1	8	2	6	7	1	8	2	7	8	6
Referenza (D90400)	G	C	G	G	G	G	A	G	C	A	A
DF-19	-	A	-	-	-	-	G	A	A	G	-
Bsb-02 (AY101598)	-	A	-	-	-	-	G	A	A	G	-
IS404 (U45928)	-	-	-	-	-	-	G	A	A	G	-
DF-03	-	-	A	A	-	A	G	A	A	G	-
DF-09	-	-	A	-	A	A	G	A	A	G	G
IS417 (U45929)	-	-	A	-	A	A	G	A	A	G	G
Bsb-08 (AY098920)	-	-	A	-	A	A	G	A	A	G	G



CONGRESSO STRAORDINARIO - Associazione Ginecologi Universitari Italiani (AGUI)

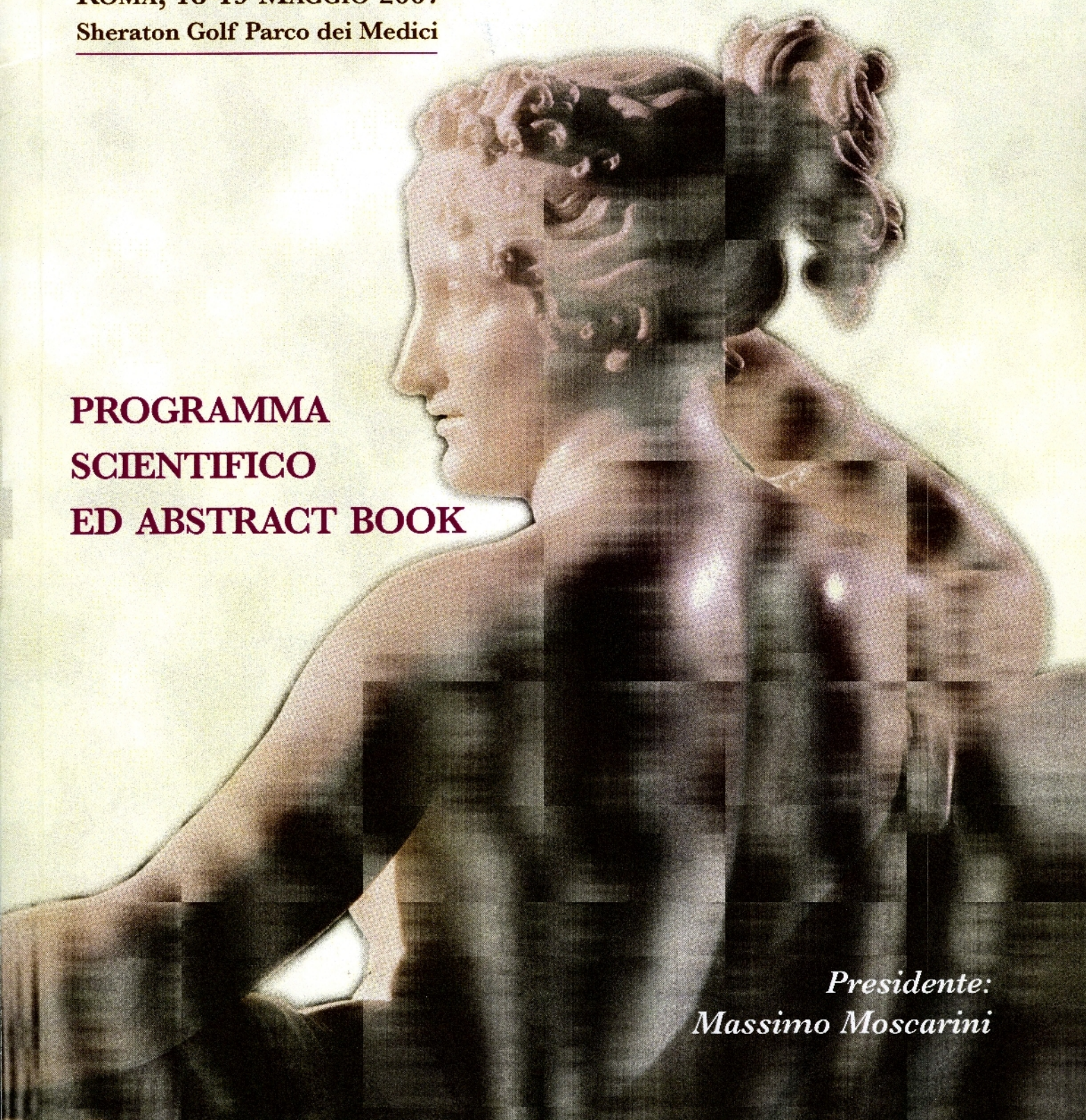
---

# Aggiornamenti in Ostetricia e Ginecologia

ROMA, 18-19 MAGGIO 2007  
Sheraton Golf Parco dei Medici

**PROGRAMMA  
SCIENTIFICO  
ED ABSTRACT BOOK**

*Presidente:  
Massimo Moscarini*





## **Varianti genotipiche di HPV ad alto rischio di donne immigrate in Campania**

G.Lavitola, R. Piccoli, L. Buonaguro, N. Stella, G. Bifulco, C. Nappi.

*Dipartimento Clinico di Ginecologia, Ostetricia e Fisiopatologia della Riproduzione Umana.*

*Università degli Studi di Napoli "Federico II"*

**Obiettivo:** Nel lavoro da noi condotto è stata analizzata una complessa problematica, relativa ai genotipi di HPV bersaglio del vaccino considerando che le IgG di L1 non danno cross-reattività e quindi un determinato vaccino anti-HPV può fornire protezione solo verso i tipi virali inclusi. Numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato che l'HPV 16 rappresenta il genotipo ad alto rischio più diffuso tra le donne italiane. Tuttavia, sono scarsi i dati relativi ai genotipi di HPV predominanti in donne immigrate in Italia. Obiettivo di questo studio è stato esaminare un gruppo di donne immigrate in Italia, provenienti principalmente dalla Nigeria e con una storia di prostituzione, al fine di identificare i genotipi di HPV e le loro varianti che si stanno diffondendo attraverso i flussi migratori.

**Disegno dello studio:** Sono state arruolate 45 donne immigrate in Italia e viventi attualmente in Campania, di cui 38 provenienti dalla Nigeria. Delle 45 donne, 14 sono risultate HIV-positive e 31 HIV-negative. La ricerca del virus nelle cellule è stata effettuata con reazione di "nested PCR", utilizzando come primers MY09/MY11 e GP5+/GP6+, e la tipizzazione virale attraverso l'analisi delle sequenze di DNA.

I dati sono stati analizzati utilizzando il test  $\chi^2$  e, quando appropriato, il test di Fisher per calcolare i valori di  $p$  relativi alle differenze tra i gruppi.

**Risultati:** Le sequenze di HPV sono state amplificate nel 42.2% dei campioni con un tasso di identificazione del 57.1% (8/14) nelle HIV positive e del 35.5% (11/31) nelle HIV-negative ( $p = 0.02$ ). I tipi maggiormente prevalenti sono risultati essere l'HPV 33, 58, 70 e 81, con una frequenza del 6.7%, seguiti da HPV 35, 54, 31, 52 e 16, in ordine di prevalenza decrescente.

Lo studio delle sequenze nucleotidiche delle regioni amplificate ha portato all'identificazione di varianti dell'HPV 16, 52 e 58, non riscontrabili tra le donne europee.

**Conclusioni:** le donne immigrate esaminate presentano una netta prevalenza di genotipi di HPV differenti dal 16 e dal 18, che rappresentano il bersaglio dei vaccini attualmente in sperimentazione. Pertanto, i vaccini andrebbero personalizzati in relazione all'area geografica a cui destinarli, in base ai differenti "cocktails" di genotipi di HPV presenti nella popolazione.

Occorrono, quindi, numerosi studi epidemiologici, compresa la sorveglianza di tutti quei gruppi a rischio che possono costituire un serbatoio di genotipi rari e delle loro varianti, per testare l'efficacia degli attuali vaccini e permettere in futuro l'elaborazione di strategie di vaccinazione più valide.

## **Prevenzione primaria dell'infezione da HPV: i due vaccini**

La scoperta della stretta correlazione tra carcinoma della cervice ed HPV ha rappresentato la premessa per una strategia di prevenzione non più secondaria, attraverso lo screening citologico ed il trattamento delle lesioni pre-neoplastiche, bensì primaria, attraverso l'introduzione di un vaccino profilattico (32).

La distribuzione dei genotipi di HPV associati al cancro della cervice è stata esaminata in una recente metanalisi condotta su circa 10000 casi. I genotipi rilevati, in ordine decrescente di frequenza, sono stati l'HPV 16, 18, 45, 31,33, 52, 58 e 35. La percentuale di carcinomi squamosi ed adenocarcinomi della cervice associati a HPV 16 e 18 è risultata rispettivamente del 70 e dell'86 % (33). Alla luce di questi dati, la ricerca si è concentrata su tali genotipi allo scopo di realizzare vaccini profilattici anti HPV ed elaborare una rivoluzionaria strategia di prevenzione del cervicocarcinoma. A tal fine, fondamentali si sono rivelati gli studi di biologia molecolare attraverso cui sono state identificate le principali caratteristiche del virus e del suo ciclo vitale.

I vaccini contro l'HPV sono costituiti da analoghi non infettivi del virus, particelle simil-virali (VLP "Virus-like Particles"), prodotte attraverso tecnologie ricombinanti. Essi sono ottenuti attraverso la sintesi in vitro della principale proteina capsidica virale L1, privata del suo potenziale oncogenico, pertanto sono inattivi, cioè non contengono prodotti biologici vitali o DNA che potrebbe infettare cellule.

I vaccini oggi in commercio hanno un esclusivo ruolo preventivo, non hanno dimostrato alcun effetto terapeutico. Infatti, il principio d'azione di tali vaccini

consiste nella stimolazione di una risposta immunologica umorale in grado di proteggere da una successiva infezione (34-36).

Le principali sperimentazioni sono state condotte su un vaccino bivalente anti HPV 16 e 18 (GlaxoSmithKline Biological's) e su un vaccino quadrivalente anti HPV 6,11,16,18 (Merck Research Laboratories): entrambe hanno fornito risultati promettenti, mostrando l'efficacia del vaccino contro l'infezione cervicale persistente da HPV 16/18 e contro le anomalie citologiche associate all'infezione da HPV 16/18.

La composizione dei due vaccini è differente:

- Gardasil è un vaccino quadrivalente contenente L1 VLPs di 2 virus ad alto rischio oncogeno (40 mcg HPV 16 e 20 mcg HPV 18) e L1 VLPs di 2 virus a basso rischio (20 mcg HPV 6 e 40 mcg HPV 11). Il solfato idrossifosfato di alluminio amorfo è l'adiuvante usato.
- Cervarix è un vaccino bivalente contenente L1 VLPs di 2 virus ad alto rischio oncogeno (20 mcg HPV 16 e 20 mcg HPV 18). L'idrossido di alluminio 50 mcg combinato con 20 mcg di 3-deacilato monofosforil lipide A, costituiscono un composto che rappresenta un nuovo adiuvante, denominato AS04 (Adjuvant System 04).

Entrambi i vaccini sono stati creati per prevenire le infezioni da HPV 16 e 18, i genotipi più comunemente associati al cervicocarcinoma. Inoltre Gardasil induce anche protezione nei confronti di HPV 6 e 11 che sono primariamente associati a malattie non neoplastiche, quali condilomi ano- genitali e ricorrenti papillomatosi respiratorie (RRP).

È da ricordare, come opportunamente sottolineato da organismi internazionali indipendenti (OMS o WHO) preposti al controllo della tutela della salute pubblica,

che l'implementazione su larga scala della vaccinazione anti-HPV ha come obiettivo finale la riduzione dei casi di cancro da HPV, in considerazione dell'ancora elevato numero di casi registrati annualmente nel mondo e soprattutto del forte impatto clinico ed economico ancora rappresentato da tale patologia per le donne ubiquitariamente. Inoltre, i genotipi HPV16/18 si associano anche ad altre patologie maligne, soprattutto genitali, che presentano però in tutto il mondo un tasso di incidenza notevolmente inferiore al carcinoma della cervice uterina. In particolare, relativamente alle lesioni precancerose del sesso femminile a localizzazione vulvovaginale, l'incidenza stimata attualmente delle VIN (Vulvar Intraepithelial Neoplasia) è pari a circa 3/100.000 mentre per le forme severe di VAIN3 (Vaginal Intraepithelial Neoplasia) è ancora più irrisoria e cioè pari a circa 0,2/100.000. Si sottolinea come peraltro, anche per queste localizzazioni, i ceppi HPV imputati nello sviluppo di una forma neoplastica conclamata sono in massima parte HPV16 e HPV18.

Sostanzialmente, sulla scorta di tali dati epidemiologici, si ritiene che i ceppi ad alto rischio oncogeno, HPV16/18 in particolare, costituiscano l'agente eziologico accertato della quasi totalità delle forme neoplastiche HPV-indotte, indipendentemente dalla localizzazione.

Diviene pertanto determinante, ai fini dell'obiettivo di sanità pubblica di prevenzione del cancro, disporre di un vaccino efficace verso le infezioni dovute ai ceppi HPV16/18, che garantisca una protezione durevole nel tempo soprattutto nei siti mucosali di possibile contatto col virus.



## RISPOSTA IMMUNITARIA CHE SEGUE L'INFEZIONE NATURALE DA HPV

La maggior parte delle infezioni da HPV è asintomatica. Circa il 90% delle infezioni è transitoria; la *clearance* si verifica generalmente entro 12 mesi.

La risposta immunitaria, indotta nel sito di infezione, coinvolge l'immunità innata, cellulo-mediata ed anticorpale secondo meccanismi non ancora del tutto compresi. La risposta immunitaria innata induce la lisi della cellula infettata e la produzione di citochine. Le cellule T, attivate dal riconoscimento di proteine virali, inducono la crescita e la maturazione delle cellule B. Sia la risposta cellulo-mediata che quella anticorpale sono necessarie per assicurare una efficace protezione contro il virus. L'induzione di anticorpi neutralizzanti specifici per L1 ed L2 , proteine del capsido virale, è critica per impedire l'instaurarsi dell'infezione e l'ingresso del virus nella cellula.

La risposta immunitaria naturale può essere insufficiente, non consentendo la risoluzione dell'infezione e risulta generalmente attenuata. Il virus non causa viremia, né infezione sistemica. L'assenza del virus nel distretto ematico e la sua caratteristica replicazione intracellulare, che non si accompagna a lisi cellulare, implicano l'impossibilità del sistema immunitario di montare una risposta anticorpale forte o di indurre quadri infiammatori accentuati. Il virus infetta i cheratinociti basali che maturano verticalmente. I virioni maturi sono prodotti solo negli strati più superficiali dell'epitelio, e vengono rilasciati nell'ambiente circostante tramite la desquamazione cellulare (37).

L'infezione con HR-HPV induce sieroconversione solo nel 54-59% dei casi entro i 18 mesi (38). La sieroconversione è lenta e solo una infezione persistente può indurre la produzione di un livello sufficiente di anticorpi. Contrarre l'infezione, e

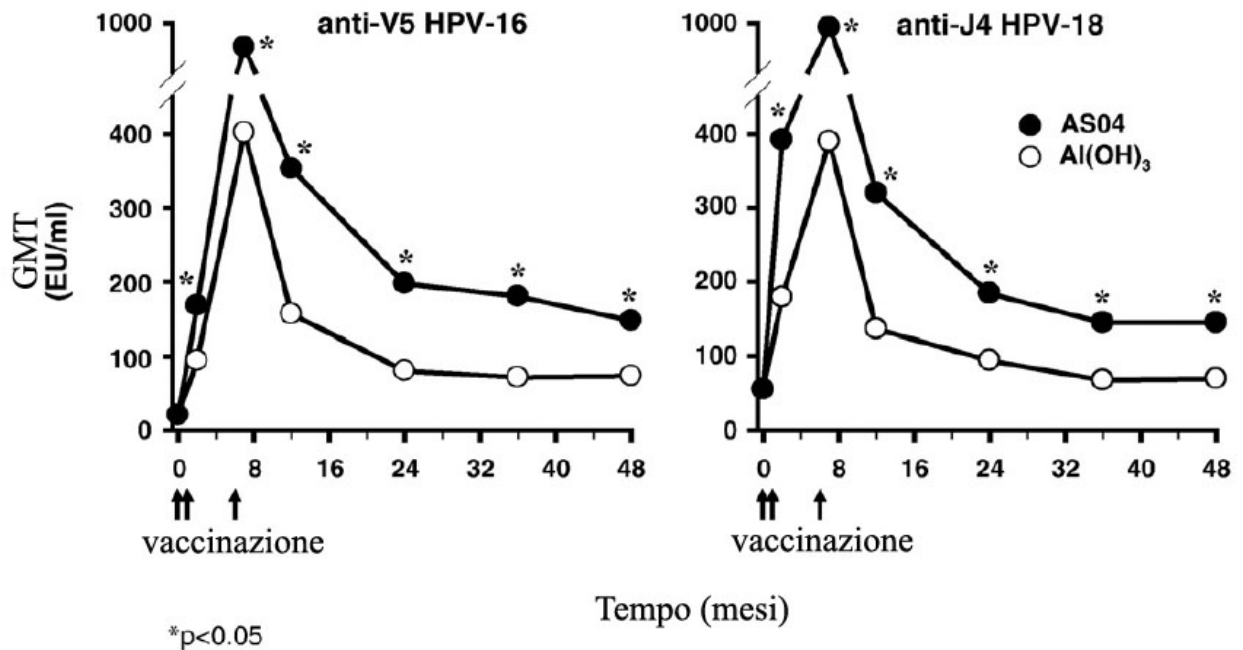
manifestare siero conversione, non impediscono una re-infezione futura anche con medesimi genotipi di HPV.

## IMMUNOGENICITÀ.

Due vaccini anti HPV sono usati nel mondo per la prevenzione del cancro della cervice.

Entrambi i vaccini sono costituiti da particelle simil virali (VLPs) non infettanti, che derivano dall'assemblaggio spontaneo di L1, proteina strutturale del capside virale, riprodotta in laboratorio con la tecnologia del DNA ricombinante. Le L1-VLPs si sono dimostrate morfologicamente ed antigenicamente simili ai virioni naturali. Esse, sono somministrate in formulazioni vaccinali contenenti uno specifico adiuvante, diverso per i due tipi. Il sistema adiuvante del Cervarix è l'ASO4, costituito da un sale di alluminio ed un agonista del recettore Toll like 4 (MPL o monofosforil lipide A). Il sistema adiuvante del Gardasil contiene l'idrofossato di alluminio. L'MPL, componente dell'ASO4, è una forma non tossica della parete cellulare di *Salmonella Minnesota*, che è in grado di potenziare la risposta immunitaria attivando le cellule dendritiche, e quindi il sistema immunitario innato. Il meccanismo d'azione dell'idrofossato di alluminio non è ancora stato completamente compreso sebbene sia stato già utilizzato come adiuvante in altre formulazioni vaccinali, attualmente commercializzate e regolarmente impiegate in numerosi paesi del mondo.

I due sistemi adiuvanti mostrano entrambi la capacità di indurre una duratura risposta anticorpale, i livelli anticorpali risultano più elevati quando si utilizza il sistema ASO4 (fig.1).

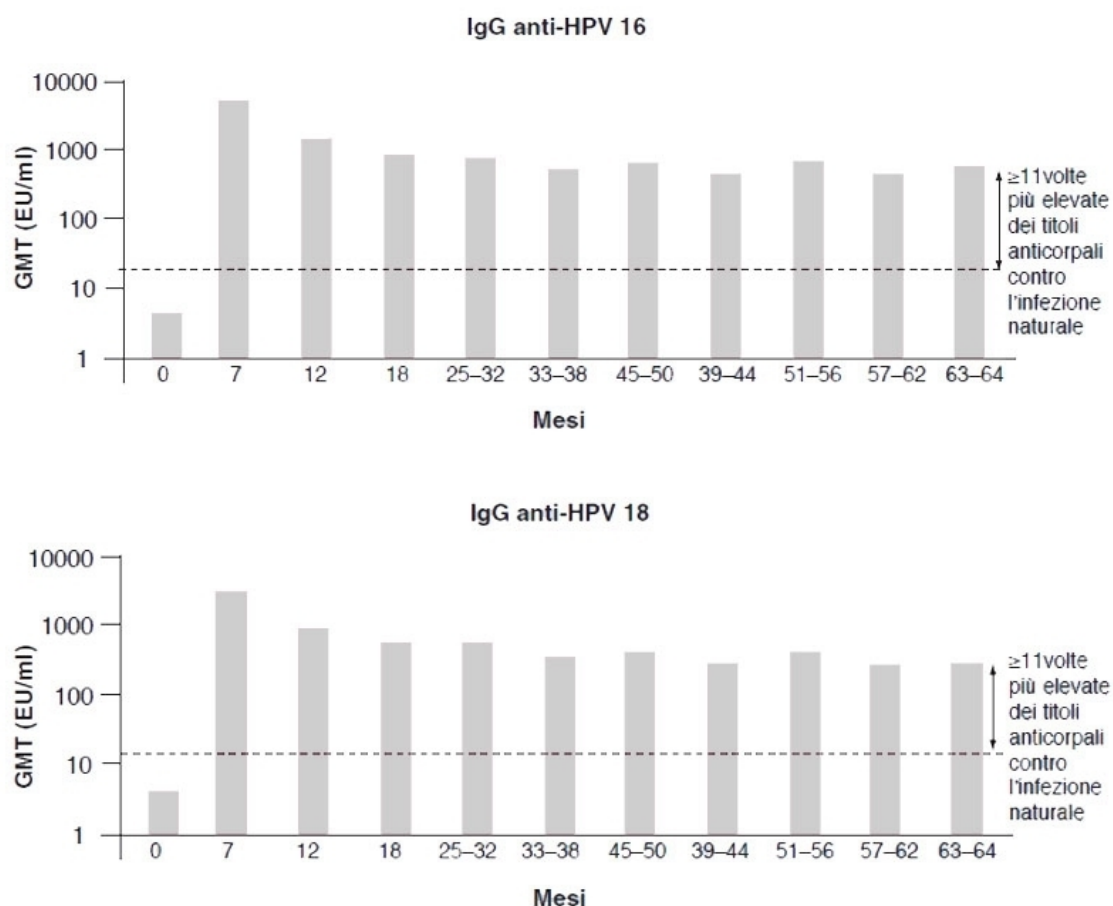


**Figura 1:** Anticorpi neutralizzanti contro HPV16/18 indotti dalla vaccinazione. Vengono paragonati i due vaccini formulati l'uno con l'idrossido di alluminio l'altro con il sistema ASO4. Il sistema ASO4 mostra una maggiore risposta immunitaria nell'uomo con la produzione di anticorpi neutralizzanti contro epitopi specifici di HPV 16 e HPV 18, V5 e J4. fonte: Giannini SL et al. 2006. 39 (39)

La risposta immunitaria indotta dal vaccino è molto differente da quella naturale. I vaccini inducono la produzione di anticorpi neutralizzanti genotipo specifici. Questi passano, tramite i meccanismi di trasudazione o di essudazione, dal siero al muco cervicale dove impediscono nuove infezioni da HPV o lo stabilizzarsi di una infezione, riducendo la carica virale, dopo il rilascio di nuove particelle virali. Anche la memoria immunitaria è importante per assicurare una risposta efficace e duratura.

I due vaccini inducono una sierconversione del 100% ad un mese dalla somministrazione delle 3 dosi vaccinali. Il picco di risposta anticorpale alla vaccinazione è decisamente più alto (100-200 volte maggiore) rispetto a quello indotto dall'infezione naturale.

I titoli anticorpali indotti da Cervarix risultano, in un primo follow up a 5.5 anni, 11 volte superiori rispetto ai titoli anticorpali indotti dall'infezione naturale (fig.2). Se stratificati per età nelle donne giovanissime (10-14 anni) il picco è due volte quello ottenuto nelle giovani (15-25 anni) e per età superiori (fino a 55 anni) il picco si mantiene maggiore di 8 volte, per almeno 2 anni, rispetto al picco corrispondente all'infezione naturale. Studi più recenti dimostrano che tali risultati si conservano immutati dopo 6.4 anni (40,41). Infine, è stato dimostrato che il mantenimento dei livelli anticorpali è costante e maggiore di 13 volte per HPV16 e di 11 volte per HPV18 rispetto all'infezione naturale, fino a 7.3 anni dopo la vaccinazione (42).

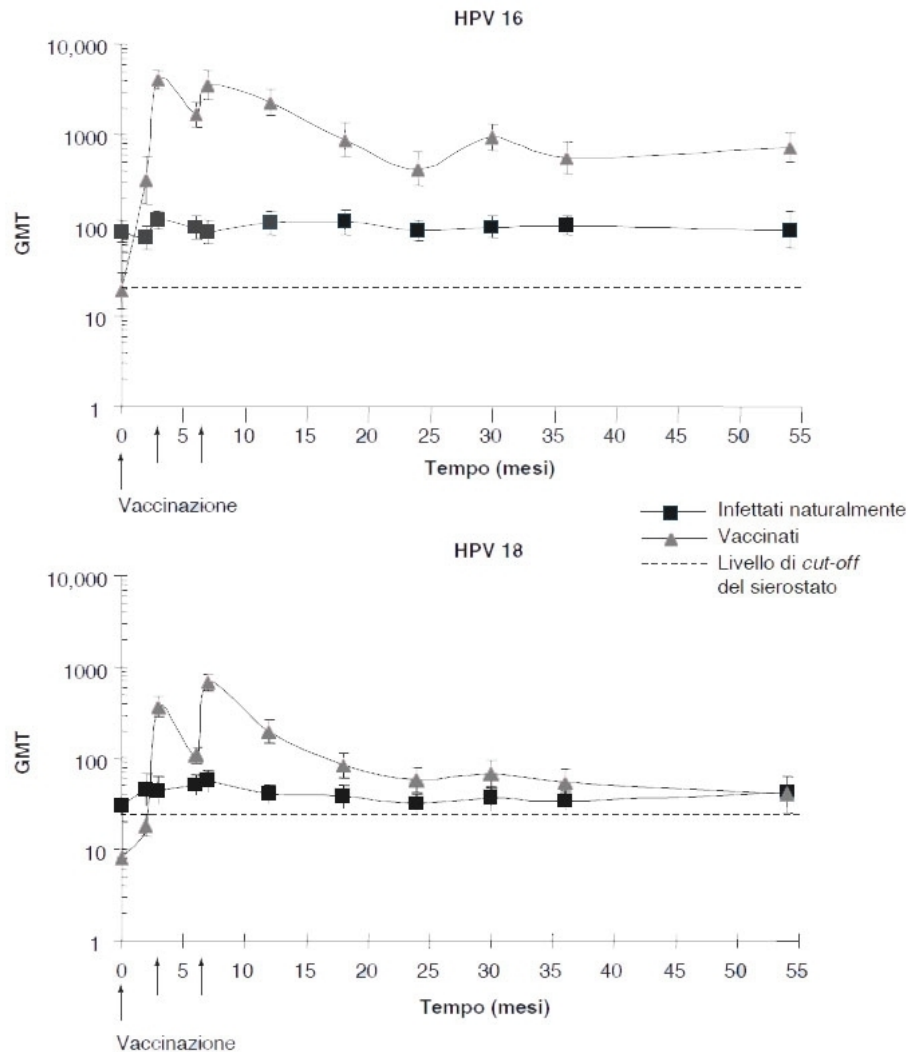


**Figura 2:** Titoli anticorpali indotti dopo la vaccinazione con Cervarix misurati mediante test ELISA, comparati con i titoli anticorpali indotti dall'infezione naturale, in un arco di 5,5 anni. (43,44).



Il vaccino Gardasil induce un elevato picco iniziale del titolo di anticorpi che rimane, per 5 anni, circa 10 volte più elevato dei titoli anticorpali indotti dall'infezione naturale (fig.3). Nelle giovanissime (9-15 anni) il picco di anticorpi è doppio rispetto alle giovani donne (15-26 anni). I titoli anticorpali anti HPV 18 subiscono un rapido decremento che, a lungo termine, dai 18 ai 60 mesi dopo, si approssima ai titoli anticorpali dell'infezione naturale (36,44).

A 5 anni dal vaccino Gardasil, solo il 65% di donne mantiene la sua sieropositività contro HPV18, ed il 98% conserva anticorpi anti-HPV16. Il Cervarix, di contro, assicura una sieropositività mantenuta superiore al 98% sia contro HPV16 che contro HPV18.



**Figura 3:** titoli anticorpali indotti dalla somministrazione di Gardasil misurati mediante cLIA paragonati a quelli indotti dall'infezione naturale (36,44).

La valutazione dell'induzione di anticorpi è eseguita tramite il calcolo della media geometrica dei titoli anticorpali (GMT). Questa dipende dal sistema di dosaggio anticorpale utilizzato e non è comparabile tra i due vaccini, se si confrontano i risultati raggiunti negli studi condotti in modo indipendente per i due prodotti. Per Cervarix, i titoli anticorpali sono stati misurati mediante test ELISA modificata, per Gardasil, tramite dosaggio immunologico competitivo Luminex (cLIA).

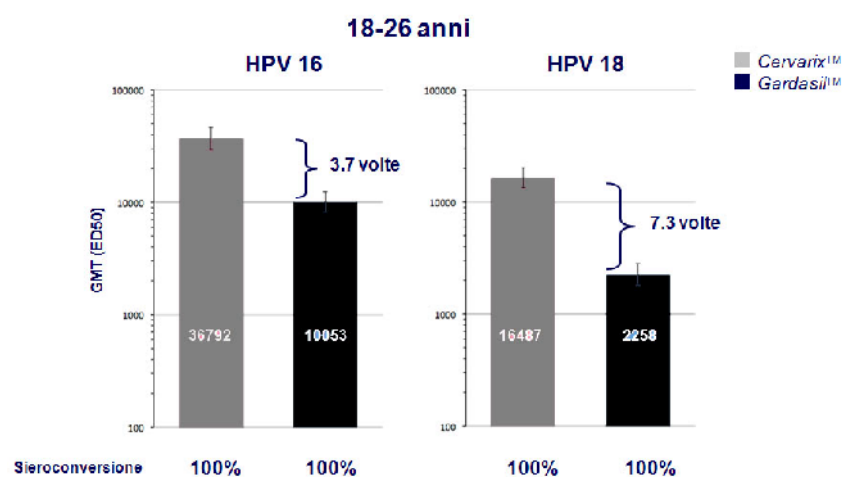
Nella suddetta tecnica ELISA, VLPs tipo-specifiche sono usate come antigeni, la reazione antigene/anticorpo è valutata tramite l'uso di anticorpi secondari marcati con enzimi. L'aggiunta di un substrato, specifico per l'enzima, induce una reazione colorimetrica la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi specie-specifici. Un altro metodo utilizzato per la valutazione di anticorpi neutralizzanti sfrutta sempre la tecnica "*inhibition ELISA*" che misura la carica di anticorpi in grado di spiazzare dal loro sito di legame anticorpi neutralizzanti specifici per epitopi di HPV16 e HPV18. Questa tecnica, però, non misura solo gli anticorpi neutralizzanti ma anche anticorpi non neutralizzanti e anticorpi cross-reagenti (45). Esistono però dimostrazioni di come i titoli di anticorpi prodotti utilizzando la metodica Elisa modificata, usata in tutti i trial con il Cervarix, siano direttamente correlabili con con quelli dosati ricorrendo alla metodica ad oggi considerata standard di riferimento: Pseudovirion Based Neutralizig Assay (PBNA) (46). Tale metodica basata sull'impiego di uno pseudovirione ha il vantaggio essere stata ideata e standardizzata in modo indipendente dal NCI (national Cancer Institute) e di consentire la misurazione di soli anticorpi neutralizzanti, reali effettori della protezione vaccinale (47).

La tecnica cLIA è, invece, in grado di misurare la concentrazione di anticorpi neutralizzanti e specie-specifici contro HPV16/18. Si misura la capacità degli anticorpi specifici di spiazzare anticorpi neutralizzanti fluorescenti dal legame con il peptide VLP. L'intensità del segnale fluorescente correla con il titolo di anticorpi monoclonali neutralizzanti del siero in esame.(48)

Un recentissimo studio, in via di pubblicazione i cui dati sono stati presentati al congresso internazionale dell'IPV (Malmo 6/12 maggio 2009) (49) si propone di

paragonare la risposta immunitaria indotta dai due vaccini, superando le differenze legate alla diversa impostazione degli studi clinici, ai diversi end point utilizzati e soprattutto alle diverse metodologie analitiche. Pertanto, in questo primo studio di confronto diretto si sono valutati i titoli anticorpalei indotti dai due vaccini, in termini di GMT, misurato tramite la tecnica più sensibile e specifica a disposizione: il saggio di neutralizzazione PBNA. La tecnica, come detto, basata sull'utilizzo di pseudovirioni prodotti in cellule umane è notevolmente più sensibile delle altre metodiche.

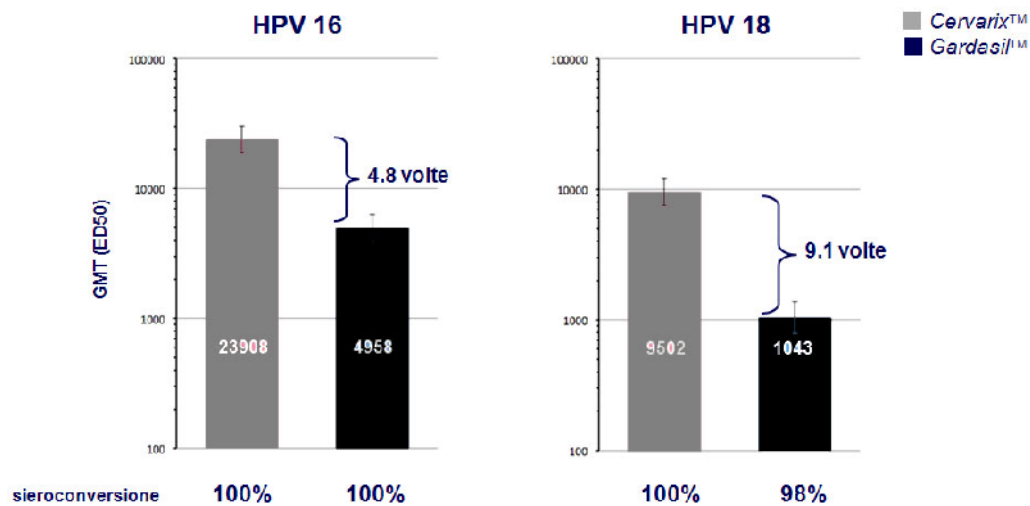
I risultati di tale studio, che continua per un periodo di follow up di un anno, mostrano che il picco anticorpale indotto da Cervarix è maggiore di quello indotto da Gardasil in modo variabile a seconda delle fasce di età, in un range variabile tra 2,3 e 4,8 volte e tra 6,8 e 9,1 volte rispettivamente per HPV16 e HPV18 (fig.4-5-6).



**Figura 4:** Anticorpi neutralizzanti ( GMT) HPV16/18 in donne dai 18 ai 26 anni a 7 mesi dal vaccino.

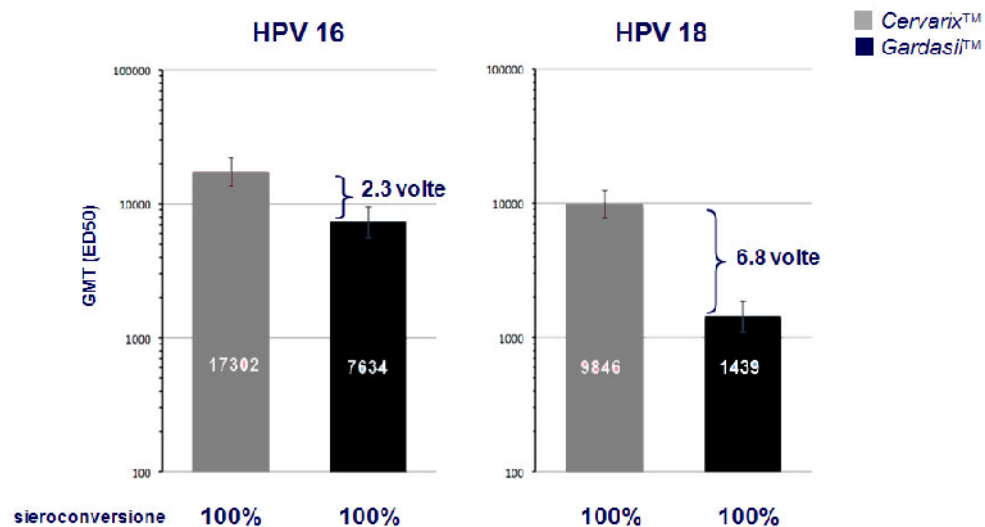


27-35 anni



**Figura 5:** Anticorpi neutralizzanti ( GMT) HPV16/18 in donne dai 27 ai 36 anni a 7 mesi dal vaccino.

36-45 anni

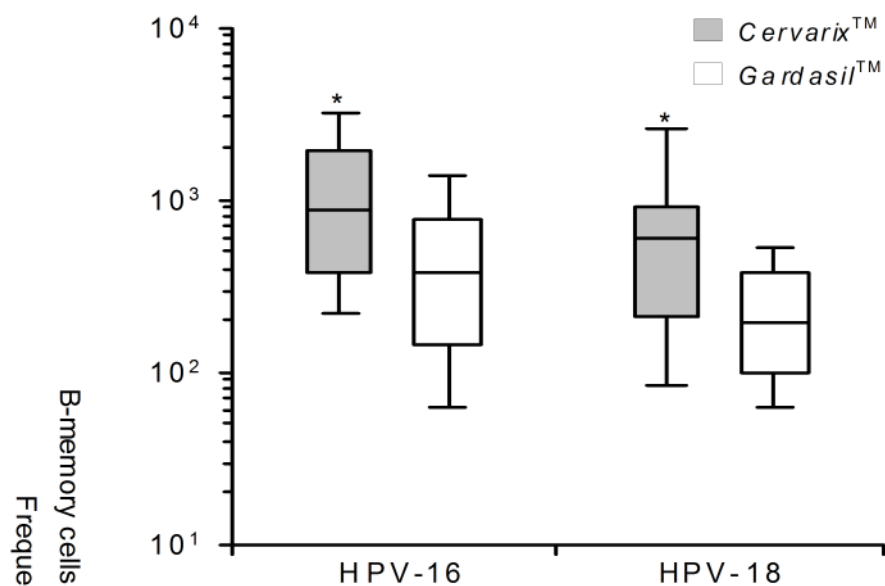


**Figura 6:** Anticorpi neutralizzanti ( GMT) HPV16/18 in donne dai 36 ai 45 anni a 7 mesi dal vaccino.

È stato dimostrato che il Cervarix induce anche la differenziazione di cellule B della memoria specifiche contro HPV16/18 L1VLP già 7 mesi dopo la vaccinazione. Ciò giustifica la presenza di una risposta anticorpale mantenuta, ad oggi, per oltre 7.3 anni (42). Non vi è alcun aumento documentato di una risposta diretta delle cellule B della memoria dopo vaccinazione con Gardasil; documentata, invece, una risposta anamnestic a una dose di richiamo del vaccino per via intramuscolo che riporta i titoli anticorpali ai livelli raggiunti dal picco post-vaccinale (50).

La presenza di anticorpi anti HPV16/18 nelle secrezioni della mucosa cervicale è stata riportata solo per Cervarix e si verifica a prescindere dall'età.

La valutazione della frequenza della risposta di cellule B della memoria è stata effettuata anche nel recente studio di confronto, presentato da Einstein all'IPVc di Malmo (49). Viene dimostrato che, da 0 a 7 mesi dopo l'esecuzione del vaccino, Cervarix, rispetto a Gardasil, induce la differenziazione di cellule B della memoria con una frequenza 2.7 volte maggiore (fig.7).



**Figura 7:** Frequenza di differenziazione di cellule B della memoria specifiche per HPV16/18, in donne dai 18 ai 45 anni.

## EFFICACIA.

L'impatto del vaccino anti HPV16/18 sulla incidenza di infezioni da HPV16/18 e di lesioni preneoplastiche ad esse correlate, è stata valutata in diversi trial clinici, che comprendono studi di fase II: GSK001/007 (Cervarix) e Merk007 (Gardasil) e studi di fase III: PATRICIA (Cervarix) e FUTUREI/II (Gardasil) le cui caratteristiche sono descritte in tabella 5.

Caratteristiche	GSK001/007	Merk007	PATRICIA	FUTURE I	FUTURE II
Vaccino	Cervarix	Gardasil	Cervarix	Gardasil	Gardasil
Fase di studio	II	II	III	III	III
Partecipanti	1.002	241	18.644	5.455	12.167
Età media (range)	20 (15-25)	20 (16-23)	20 (15-25)	20 (16-24)	20 (15-26)
Numero di partner sessuali	≤ 6	≤ 4	≤ 6	≤ 4	≤ 4
Frequenza dello screening	6 mesi	6 mesi	12 mesi	6 mesi	12 mesi
Follow up	66 mesi	60mesi	15 mesi	48 mesi	36 mesi
Primo endpoint	Incidenza di infezioni da HPV16/18	Infezioni persistenti (4 mesi) da HPV6/11/16/18 e lesioni genitali esterne o interne (CIN)	HPV16/18 CIN2+	HPV6/11/16/18 CIN1+	HPV16/18 CIN2+
Secondo endpoint	Infezione persistente (6 mesi), CIN1+, CIN2-3+, effetti avversi.	Effetti avversi	Infezione persistente (6 mesi) o CIN1+, effetti avversi	Effetti avversi	Effetti avversi

**Tabella 5:** Tabella riassuntiva delle principali caratteristiche dei trial clinici eseguiti sui vaccini (49)

Le misure di efficacia dipendono dalla popolazione studiata, e quindi dai criteri di inclusione e di esclusione dallo studio, ma anche dalla definizione di endpoint di efficacia e dalla definizione di un *follow up* compatibile con questi.

Vale la pena di specificare che l'*endpoint* ultimo: lo sviluppo di carcinoma della cervice uterina non può essere considerato, per motivi etici, un end point accettabile, oltre al fatto che non risulta valutabile nei periodi di *follow up* in quanto si sviluppa diversi decenni dopo l'acquisizione dell'infezione. Nessun vaccino ha quindi, allo stato dell'arte, dimostrato l'effettiva capacità di agire in modo da prevenire il cancro della cervice. Da qui la necessità di scelta di *endpoint* "surrogati": le infezioni persistenti della durata di 4-6 mesi, piuttosto che quelle incidenti, le quali spesso si



risolvono spontaneamente; e le lesioni CIN1-3 conseguenti all'integrazione dell'HPV nel genoma e quindi precursori del cancro della cervice.

Comprendere i risultati sviluppati in modo autonomo dalle due aziende sull'efficacia dei due vaccini può essere estremamente difficile per i differenti tipi di analisi impiegate nonché per le popolazioni adottate. La popolazione in studio, viene generalmente, stratificata come segue:

- Popolazione 1: ATP (*According to protocol*) donne che hanno ricevuto le 3 dosi del vaccino, negative all'HPV-DNA, sieronegative ai genotipi presenti nel vaccino, al momento della prima somministrazione. Rappresentano i soggetti ideali che aderiscono completamente al protocollo di studio.
- Popolazione 2: ITT (*Intention To Treat*) donne il cui stato infettivo e la presenza di lesione HPV correlata (citologia sia positiva sia negativa) non è conosciuto prima della somministrazione del vaccino o del placebo.
- Popolazione 3: MITT (*Modified Intention To Treat*) tutte le donne della sperimentazione eccetto quelle sieropositive, o HPV-DNA positive ai genotipi di HPV presenti nel vaccino, che hanno assunto almeno una dose di vaccino e che si discostano per diverse ragioni dai gruppi ATP o ITT.
- Popolazione 4: TVC (*Total Vaccinated Cohort*) tutte le donne della sperimentazione. Comprende donne HPV-DNA negative ai genotipi di HPV presenti nel vaccino, con citologia normale, ASCUS/L-SIL, che hanno assunto almeno una dose del vaccino.
- Popolazione 5: PPR (*per-protocol*) donne che hanno ricevuto il vaccino prima di mostrare sieropositività e prima di essere esposte al virus e che restano negative all'HPV-DNA per un mese di *follow up*.

- Popolazione 6: USP (popolazione suscettibile non ristretta) donne sieronegative e negative all'HPV-DNA dei genotipi presenti nel vaccino con citologia alterata o non, che hanno assunto almeno una dose di vaccino.
- Popolazione 7: PPSP donne sieronegative e negative all'HPV-DNA 16/18 alla prima vaccinazione e DNA negative a sette mesi che hanno assunto le 3 dosi di vaccino.

Per maggiore chiarezza possiamo assumere che le popolazioni ATP, PPR e PPSP rappresentano donne che non sono mai entrate in contatto con il virus del papilloma umano e che hanno completato il protocollo vaccinale senza violazioni. Rappresentano i soggetti ideali e per cui ci si aspetta una efficacia massima.

Le popolazioni TVC, USP ed ITT comprendono tutte le donne il cui stato infettivo e la presenza di lesioni HPV correlata è misconosciuta. Rappresentano una larga parte di popolazione che può essere entrata in contatto con il virus durante la vita (donne sessualmente attive).

Le diverse popolazioni studiate mostrano dati di efficacia diversi come evidenziato in tabella 6.

	Endpoint	Efficacia %						
Gardasil		ATP	PPR	MITT	ITT	TVC	USP	PPSP
MERCK 007	Infezione persistente (4 mesi)	96		94				
	CIN1+, AIS	100		100				
FUTURE I	CIN1+, AIS	100	100	98	62, 83		98	
	CIN2/3+	100	100		30, 12		100	
FUTURE II	HPV16 CIN1+, HPV18 CIN1+		94	95	44	98	100, 95	
	CIN2/3+		100, 97		57, 45		95	98
Cervarix								
GSK 001/007	Infezione persistente (6 mesi)	96		94				
	Infezione persistente (12 mesi)	100		94				
	CIN1+, CIN2+				100			
PATRICIA	Infezione persistente (6 mesi)			80		80		
	Infezione persistente (12 mesi)			76				
	HPV 16 CIN1+, HPV18 CIN1+		94, 100	89, 90				
	CIN2/3+		100			90		

**Tabella 6:** tabella riassuntiva l'efficacia dei due vaccini, nelle diverse popolazioni in esame, e per i diversi endpoint previsti (51-54).

Negli studi di fase II l'efficacia nella prevenzione di infezioni incidenti, persistenti, alterazioni citologiche e di neoplasie CIN associate ai tipi di HPV presenti nei vaccini si è rivelata molto alta a prescindere dalle popolazioni ATP (100%) o MITT (94%) per entrambe i vaccini. Nella popolazione MITT la percentuale inferiore riflette in parte una minor efficacia del vaccino alla somministrazione di una sola dose vaccinale.

L'efficacia vaccinale più ampia, negli studi di fase III, si riscontra nella popolazione di donne HPV-DNA negative e sieronegative ai tipi di HPV correlati con il vaccino. Le sperimentazioni ribadiscono l'elevata efficacia vaccinale contro le CIN2/3. Entrambi i vaccini forniscono eccellente protezione contro qualunque neoplasia CIN attribuita ad HPV16/18.

L'efficacia di Gardasil in una popolazione mista di donne (ITT) con malattia diffusa (meno del 30% positive all'HPV.DNA test) che avevano assunto almeno una dose di vaccino è 44-57%. Gardasil non è attivo contro lo sviluppo di CIN causate da HPV 16/18 se, le donne in esame, si presentano con infezione da uno dei detti tipi di HPV. Cervarix analogamente non favorisce la *clearance* dell'epitelio già infettato da HPV16/18. Le donne negative all'HPV-DNA test ma sieropositive, e quindi che hanno contratto l'infezione in passato sono risultate invece protette da lesioni CIN2+ causate da HPV16/18 in periodi di *follow up* di 3 anni sia per Cervarix che per Gardasil.

#### CROSS-REATTIVITÀ

Essendo filogeneticamente correlati, i genotipi di HPV appartenenti alle specie alpha ad alto rischio oncogeno condividono gli epitopi del capsido che possono pertanto elicitare una risposta immune cross-reattiva, ma, sebbene la cross-reattività sierologica sia stata dimostrata in studi epidemiologici su donne naturalmente infettate dal virus HPV con e senza lesioni, gli anticorpi neutralizzanti elicitati dal vaccino, invece, sembrano essere largamente tipo-specifici.



La recente dimostrazione della possibilità di una cross-protezione contro altri genotipi di HPV è un argomento estremamente importante, poiché ciò potrebbe notevolmente aumentare la frazione di cervicocarcinomi prevenuti.

La World Health Organization (WHO) raccomanda che la dimostrazione della cross-protezione è possibile nel momento in cui si osservano riduzioni nell'incidenza di CIN di qualunque grado e di AIS correlati ai genotipi di HPV presi in esame, e/o l'assenza della persistenza dell'infezione virale, definita come rilevamento, in campioni cervico-vaginali ottenuti a 6, 12 o 18 mesi, dei genotipi HPV presi in esame.

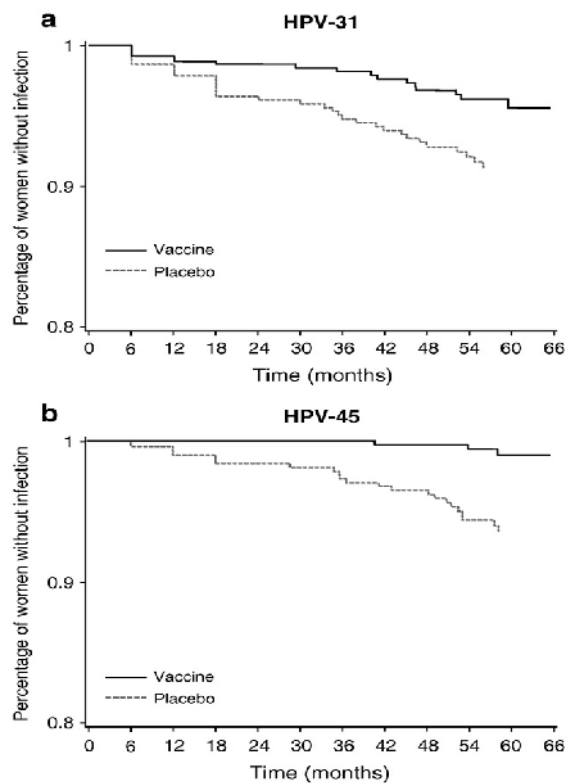
Nello studio Brown et al. (55), viene valutata la cross-protezione indotta dal vaccino Gardasil nei confronti di 5 ceppi HPV che presentano una omologia di sequenza aminoacidica per la proteina L1 >80% rispetto alla proteina L1 di HPV 16 e 18. Essi sono HPV 31, 33, 45, 52 e 58. È stata valutata anche la cross-protezione per 5 genotipi di HPV che presentano una omologia <80% per la proteina L1 di HPV 16 e 18. Essi sono HPV35, 39, 51, 56 e 59. Questo studio è stato condotto su una popolazione di donne tra i 16 e i 26 anni naive, cioè sieronegative e Dna negative per i ceppi presi in esame. La vaccinazione ha ridotto l'incidenza di HPV 31 e 45 del 40,3% e di CIN1-3/AIS del 43,6% rispettivamente. La riduzione dell'incidenza dell'infezione da HPV 31, 33, 45, 52, 58 e di CIN1-3/AIS è del 25% e del 29,2% rispettivamente. È maggiore la riduzione di incidenza di lesioni associate ad HPV-31 rispetto agli altri ceppi presi in esame. Questa maggiore cross-reattività per HPV 31 potrebbe essere spiegata dal fatto che questo genotipo è strettamente correlato ad HPV 16 con una omologia pari all'83%.

Lo studio Wheeler et al (56) valuta, invece, la cross-protezione indotta dal vaccino Gardasil nei confronti degli stessi ceppi virali presi in esame da Brown et al nella popolazione ITT, cioè in donne che, prima della vaccinazione, risultavano positive ad almeno 1 dei 14 genotipi di HPV presi in esame e/o presentanti lesioni da HPV. La vaccinazione riduce la prevalenza di infezione da HPV 31, 33, 45, 52, 58 del 17.7% e di CIN 1-3/AIS del 18.8% e quella di CIN1-3/AIS associata ad HPV 31, 58 e 59 del 26.0%, 28.1% e 37.6% rispettivamente.

Come ci si poteva aspettare, l'efficacia contro l'infezione e le lesioni da HPV è generalmente più alta nella popolazione naive rispetto alla popolazione ITT.

La review di Jenkins (57) valuta la cross-protezione indotta dal vaccino Cervarix nei confronti dei ceppi virali HPV 45, 31, 33, 52 e 58 attraverso la rilevazione dell'incidenza dell'infezione sostenuta da questi genotipi in donne naive mediante un follow-up di 5 anni dopo vaccinazione e attraverso la valutazione della protezione contro la persistenza dell'infezione in donne ITT per 6 o più mesi.

Nel gruppo naive è stata rilevata una cross-protezione sostenuta contro HPV 45 e 31 per l'intero periodo del follow-up con una efficacia pari all'88% per HPV 45 e al 54% per HPV 31 (fig. 8).



**Figura 8:** cross protezione in un gruppo naive verso HPV 31 e 45

Inoltre la cross-protezione contro infezioni persistenti per più di 6 mesi, definite come riscontro di DNA dei ceppi di HPV presi in esame e non contenuti nel vaccino in due prelievi citologici cervicali consecutivi nell'arco di più di 6 mesi, è osservata per HPV 45, 31 e 52 (tab.7).



**Tabella 7:** efficacia del vaccino, in una coorte totalmente vaccinata nell'ambito della Fase III del PATRICIA trial, contro infezioni persistenti per più di 6 mesi da parte di genotipi HPV oncogeni (NCT00122681).

	Gruppo	N	n	Efficacia del vaccino % (97,9%CI)
<b>HPV 45</b>	HPV	6724	10	59.9 (2.6–85.2)
	Controllo	6747	25	
<b>HPV 31</b>	HPV	6615	47	36.1 (0.5–59.5)
	Controllo	6667	74	
<b>HPV 33</b>	HPV	6702	31	36.5 (–9.9–64.0)
	Controllo	6736	49	
<b>HPV 52</b>	HPV	6532	79	31.6 (3.5–51.9)
	Controllo	6573	116	
<b>HPV 58</b>	HPV	6688	43	–31.4 (–132.1–24.7)
	Controllo	6734	33	

Controllo: donne vaccinate contro HAV; gruppo HPV, donne vaccinate con Cervarix; N, numero di donne incluse in ciascun gruppo; n, numero di donne che hanno riportato almeno un'infezione da HPV durante il follow-up in ciascun gruppo.

La cross-protezione a 5 anni dalla vaccinazione con Cervarix mostra un'efficacia contro CIN 2 del 68% circa (Tab. 8).

**Tabella 8:** efficacia del vaccino in donne con anomalie citologiche e istologiche indipendentemente dalla presenza di positività per HPV-DNA. Risultati dopo 5.5 anni di follow-up.

Endpoint	Vaccino		Placebo		Efficacia del vaccino % (95% CI)
	N	n	N	n	
<b>ASC-US</b>	505	106	497	155	38.2 (20.4–52.2)
<b>LSIL</b>	505	51	497	81	41.8 (16.3–59.8)
<b>CIN1+</b>	505	15	497	32	55.2 (14.9–77.5)
<b>CIN2+</b>	505	5	497	15	67.8 (6.8–90.8)

N, numero di donne incluse in ciascun gruppo; n, numero di donne che hanno riportato almeno un'infezione da HPV durante il follow-up in ciascun gruppo.

Nello studio di Skinner et al (58), il Cervarix ha mostrato un'alta efficacia contro CIN 2 associato ad HPV 16 e 18 ed è stata anche valutata la cross-protezione contro CIN 2 associata con altri genotipi HPV oncogeni. La popolazione di riferimento è costituita da donne di età compresa tra i 15 e i 25 anni con normale citologia,

sieronegative per HPV 16 e 18 e DNA negative per i 14 genotipi di HPV presi in esame. Il campione cervicale è stato, inoltre, prelevato ogni 6 mesi per la ricerca di eventuale DNA virale. L'efficacia del vaccino è risultata del 100% per le lesioni CIN 2 associate ad infezione da HPV 31 e 45; del 68.2% per quelle associate ai 5 più frequenti ceppi oncogeni HPV 31, 33, 45, 52, 58; del 68.4% per i 10 più frequenti ceppi oncogeni HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59; del 66.1% per le lesioni CIN 2 associate ad HPV appartenenti alla specie A9 HPV 31, 33, 35, 52, 58; e del 77.3% per quelle associate ad HPV della specie A7 HPV 39, 45, 59, 68. Da questo studio si evince pertanto che la vaccinazione delle donne naive per infezione da HPV con Cervarix induce una significativa cross-protezione contro le lesioni CIN 2 associate ai genotipi HPV su menzionati non contenuti nel vaccino.

Pertanto, il confronto tra la cross-protezione indotta dal vaccino quadrivalente Gardasil e quella indotta dal vaccino bivalente Cervarix evidenzia un'efficacia verso gli altri ceppi virali oncogeni abbastanza simile (tab. 9), eccezion fatta per la cross-protezione contro HPV 45 e 58. Infatti il solo Cervarix è capace di indurre cross-protezione nei confronti di questi ceppi, come dimostrato dallo studio di Herrero (59).

**Tabella 9:** confronto tra l'efficacia del vaccino quadrivalente Gardasil e quello bivalente Cervarix in donne con infezione da ceppi HPV oncogeni persistente da più di 6 mesi.

<b>Efficacia contro i genotipi indicati % (CI) (a)</b>					
<b>Vaccino</b>	HPV 31	HPV 33	HPV 45	HPV 52	HPV 58
<b>Gardasil</b>	46.2(15.3 to 66.4)	28.7(-45.1 to 65.8)	7.8(-67.0 to 49.3)	18.4(-20.6 to 45.0)	5.5(-54.3 to 42.2)
<b>Cervarix</b>	36.1(0.5 to 59.5)	36.5(-9.9 to 64.0)	59.9(2.6 to 85.2)	31.6(3.5 to 51.9)	-31.4(-132.1 to 24.7)

(a) Intervalli di confidenza: 95% per Gardasil e 97.5% per Cervarix.

Questi dati sono di fondamentale importanza tenendo conto del fatto che i ceppi HPV 16 e 18 sono responsabili di circa il 70% dei cervicocarcinomi nel mondo; i

ceppi HPV 45 e 31 sono associati ad un altro 10% circa di cancri della cervice; i ceppi HPV 33 e 52 contribuiscono per un altro 5-7%. Questi sei genotipi risultano, in definitiva, associati a circa l'85-87% dei casi di cervicocarcinoma.

Inoltre HPV 18 e 45, insieme a HPV 16, sono presenti in più del 90% di adenocarcinomi endocervicali e HPV 45, in assoluto, è il terzo genotipo più frequentemente associato al cervicocarcinoma e all'adenocarcinoma.

Un altro aspetto molto importante della discussione è che in assenza di un'ampia cross-protezione, il ruolo giocato dai genotipi non contenuti nel vaccino, nello sviluppo delle lesioni come agenti causali, sia delle lesioni precancerose che dei carcinomi hpv-correlati, sembra essere estremamente decisivo nello sviluppo futuro dell'attività vaccinale.

Pertanto alla luce delle attuali evidenze scientifiche il Cervarix sembra avere delle caratteristiche che lo pongono decisamente in una dimensione "oncologica" che è l'aspetto pregnante dell'obiettivo della campagna di sanità pubblica.

In conclusione, possiamo affermare che la messa a punto di vaccini profilattici contro l'HPV, ovvero i primi vaccini contro un cancro della specie umana, è tra le acquisizioni più rilevanti in tema di prevenzione oncologica degli ultimi decenni. La concreta possibilità di generare una protezione immunitaria contro l'HPV ad alto rischio si può tradurre in una netta riduzione di incidenza delle patologie correlate a questi genotipi, con l'ottenimento di benefici clinici di grande portata socio-sanitaria. Entrambe le formulazioni appaiono prive di sostanziali effetti collaterali, anche in occasione di avvenute gravidanze, tuttavia sono necessarie alcune precisazioni sul loro utilizzo:



- Il target ideale è rappresentato dalla giovane età adolescenziale (tra 9 e 15 anni), cioè in periodo pre-coitarcale laddove quindi non c'è stato contatto con il virus naturale;
- Le giovani più adulte (16-26 anni) possono trovare egualmente beneficio dalla vaccinazione, dato che molte di esse sono ancora negative per i genotipi vaccinali;
- La copertura di un'ampia quota di popolazione femminile consentirà di escludere il sesso maschile dalla vaccinazione stessa;
- Il programma vaccinale dovrà integrarsi con lo screening citologico esistente, di cui si raccomanda tassativamente il proseguimento secondo le regolamentazioni vigenti.

## **CAPITOLO 1: patologia pre-neoplastica e neoplastica dell'esocervice**

### **Le lesioni preneoplastiche**

Studi epidemiologici ed anatomopatologici hanno dimostrato con sempre maggiore evidenza che la maggior parte dei tumori invasivi della cervice sono preceduti da lesioni (CIN: Neoplasia Intraepiteliale cervicale) di vario grado (lieve, moderato e severo) confinate nel contesto dell'epitelio squamoso dell'esocervice, che possono persistere come tali anche per lungo tempo e che sono suscettibili di trattamenti conservativi capaci di impedirne, nella quasi totalità dei casi, la progressione verso forme invasive.

Queste lesioni sono delle vere e proprie displasie, termine che significa letteralmente proliferazione disordinata, caratterizzate da una varietà di modificazioni che comprendono la perdita di uniformità dell'aspetto delle singole cellule e del loro orientamento nell'architettura del tessuto. Di fondamentale importanza, nella definizione di displasia, è la presenza di figure mitotiche più numerose rispetto alla norma con localizzazioni anomale all'interno dell'epitelio. Infatti, negli epiteli squamosi stratificati displastici le mitosi non sono confinate allo strato basale, ma possono apparire a tutti i livelli, anche tra le cellule più superficiali.

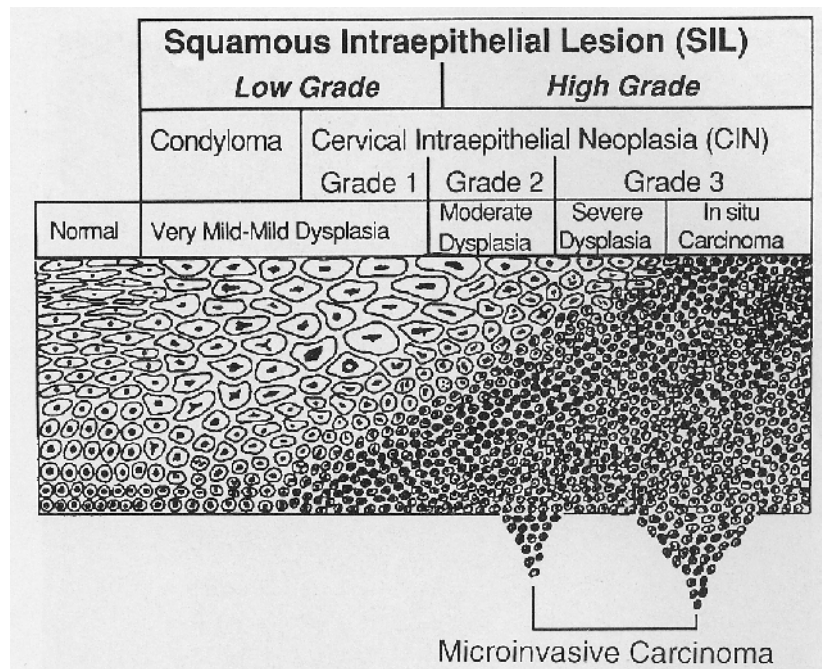
Normalmente le cellule alte dello strato basale maturano progressivamente, trasformandosi in cellule piatte nello strato superficiale. Nella displasia, questa organizzazione può essere perduta e sostituita da ammassi disordinati di cellule simili a quelle basali. Quando la displasia è marcata e coinvolge l'intero spessore

dell'epitelio, la lesione viene considerata come una forma di neoplasia pre-invasiva, definita carcinoma in situ, in quanto non vi è il superamento della membrana basale.

Si definiscono lesioni preneoplastiche (CIN) dell'esocervice tutte quelle condizioni caratterizzate da graduale proliferazione di cellule atipiche con variabile potenzialità evolutiva verso il carcinoma invasivo della cervice uterina. Lo spettro delle alterazioni della CIN comprende: modificazioni citologiche quali alterazione del rapporto nucleo/citoplasma per ingrandimento del nucleo; atipie nucleari quali cromatina irregolarmente distribuita, membrana nucleare irregolare, presenza di nucleoli; alterazione del numero delle cellule e modificazioni architetturali dell'epitelio squamoso pluristratificato quali alterazioni della polarità e della differenziazione cellulare; la ploidia cellulare, cioè il contenuto in DNA della cellula.

Sono stati identificati tre gradi di precursori del carcinoma cervicale: CIN 1, 2 e 3. I primi due corrispondono rispettivamente alla displasia lieve e moderata, il terzo alla displasia grave e al carcinoma in situ (fig.9). Più precisamente, nell'ambito di CIN 1 rientrano lesioni che mostrano solo atipia colilocitica (effetto citopatico virale) e cellule atipiche negli strati epiteliali più superficiali. Il successivo grado, CIN 2, consiste nella comparsa di cellule atipiche negli strati più bassi dell'epitelio che, tuttavia, mostra normale maturazione e cheratinizzazione progredendo verso la superficie. Quando tutto lo spessore dell'epitelio è sostituito da cellule atipiche immature, senza differenziazione superficiale, l'alterazione è denominata CIN 3 (60).





**Figura 9:** Classificazione delle lesioni CIN

Su tale base è nato e si è diffuso nel mondo (in Finlandia nel 1965, negli USA nel 1970, in Gran Bretagna nel 1987, etc) lo screening del cervicocarcinoma, che coinvolge la popolazione femminile sessualmente attiva, in una fascia di età compresa tra i 25 ed i 64 anni, volto ad identificare le lesioni preneoplastiche dell'eso e dell'endocervice utilizzando una metodica di facile esecuzione e di basso costo comunemente conosciuta come citologia cervico-vaginale o, meglio, pap-test, ideata nel 1945 da George Papanicolau (fig. 10).

Oggi, però, si discute molto sulla necessità di includere nello screening anche donne di età inferiore ai 25 anni, in quanto è stato evidenziato un aumento dell'incidenza di lesioni precancerose, ed anche francamente cancerose, a livello del collo dell'utero in donne appartenenti a fasce di età sempre più giovani. Ciò sarebbe dovuto alla maggiore permissività in campo sessuale e conseguente maggiore diffusione dell'HPV. Queste ultime considerazioni, in associazione alla

consapevolezza che lo striscio cervico-vaginale è un test di screening gravato da un elevato numero di falsi negativi, tendono ad avvicinare maggiormente la nostra condotta di screening a quella delle Linee Guida dell'American College of Obstetrics and Gynecology (ACOG):

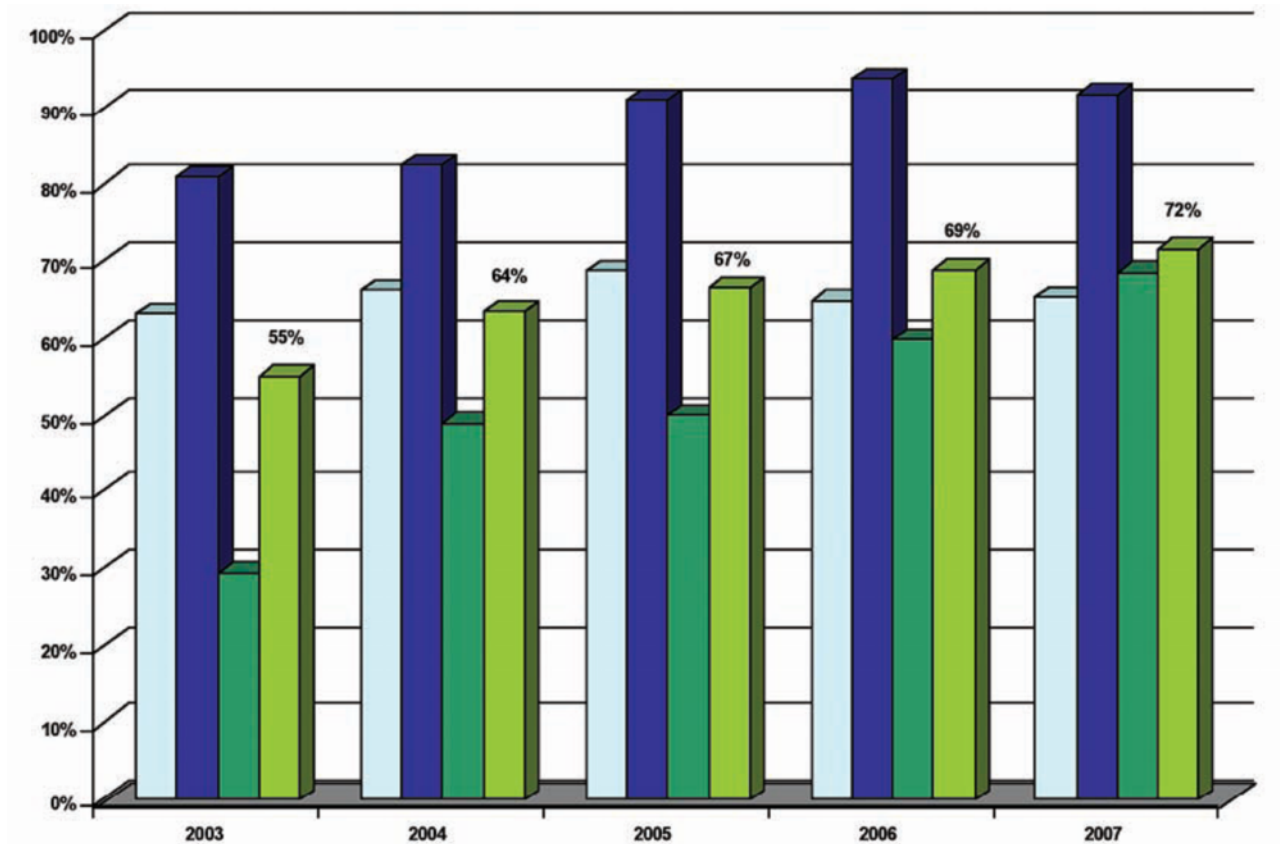
- inizio dello screening dopo 3 anni dall'inizio dell'attività sessuale e comunque non dopo i 21 anni (eccetto che per donne virgo);
- ripetizione del test su base annuale sino al raggiungimento dei 30 anni;
- incremento dell'intervallo a 2-3 anni per le donne di età superiore ai 30 anni con almeno 3 esami consecutivi negativi;
- riduzione dell'intensità di screening per le donne di età superiore ai 70 anni, senza però una definizione assoluta di interruzione dello screening;
- intervalli biennali se utilizzata la citologia su strato sottile;
- intervalli triennali per le donne al di sopra dei 30 anni che sono risultate negative al pap-test ed al test per il DNA dei tipi oncogeni dell'HPV;
- triage con HPV DNA test per gli esiti ASCUS, con invio alla colposcopia dei soli ASCUS positivi per tipi virali ad alto rischio.



**Figura 10:** George Papanicolau

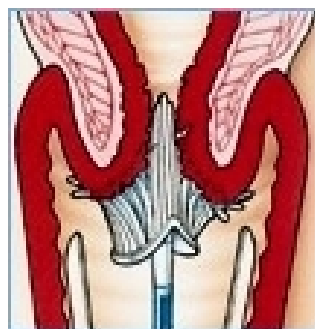
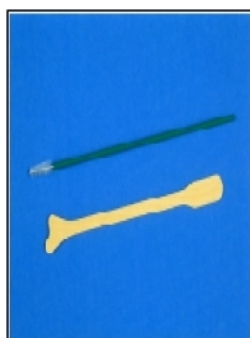
In Italia, la diagnosi precoce del cancro della cervice uterina si è basata per molti anni sull'iniziativa spontanea delle donne. Ciò ha condotto ad una copertura incompleta della popolazione femminile (meno del 50%) per la quale lo screening è indicato. Nel 1996 nasce il Gruppo Italiano Screening del Cervico Carcinoma (GISCi), un'Associazione senza scopi di lucro che si propone la promozione e qualificazione dell'attività di screening organizzato del cancro del collo dell'utero. Pertanto è a partire dal 1996 che in Italia è raccomandata l'attivazione di programmi di screening organizzato del cancro cervicale su base regionale (61,62). Tali raccomandazioni, largamente basate sulle linee guida europee (63,64), includono gli inviti personali (attraverso lettera, con appuntamento prefissato) alle donne di età compresa tra i 25 e 64 anni per eseguire un pap test ogni 3 anni; invio a colposcopia per gli esiti del pap-test anormali. Secondo le ultime rilevazioni dell'Osservatorio Nazionale di Screening (dati del 2008) nel 2007 il 71,8% del territorio nazionale ha effettuato un pap-test nell'ambito di un programma di screening organizzato (fig.11).





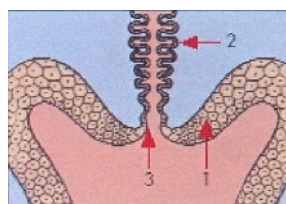
**figura 11:** Estensione teorica dei programmi di screening cervicale per zona geografica. Survey ONS 2003-2007

L'affidabilità di tale screening è legata all'accuratezza del prelievo. È, infatti, necessario un campione cellulare rappresentativo da sottoporre all'esame citologico (fig 12).

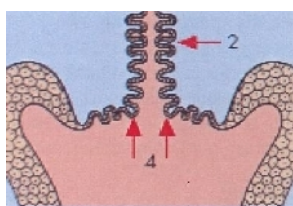


**Figura 12:** Prelievo citologico

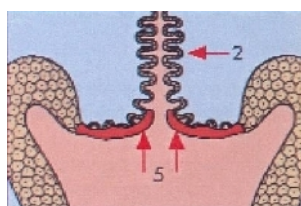
Più precisamente, il pap-test deve contenere cellule provenienti dall'esocervice, dall'endocervice e dalla zona di trasformazione. In quest'ultima zona, appunto, si sviluppano le lesioni squamose intraepiteliali (SIL), ovvero le lesioni preneoplastiche dell'esocervice, e le lesioni ghiandolari (AGC). Non è sempre agevole identificare tale zona di trasformazione, in quanto la sua localizzazione cambia nel corso della vita, a seconda dell'età e delle varie fasi della vita riproduttiva (fig 13). Infatti il prelievo potrà risultare inadeguato soprattutto in peri e post- menopausa, quando la giunzione squamo-colonnare (GSC) è fisiologicamente risalita nel canale cervicale o vi è stenosi dell'orificio uterino esterno. Questo ed altri fattori, come scarsità del materiale, spiccata flogosi, eritrociti che oscurano il materiale cellulare, errori di allestimento del vetrino, possono essere alla base di risultati falsamente negativi al pap-test.



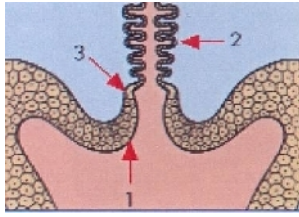
Dopo la pubertà, nel periodo della maturità sessuale, la “giunzione squamocolonnare” può coincidere con l’orifizio uterino esterno od essere esterna ad esso



Modificazioni ormonali durante la pubertà e la gravidanza possono determinare l'eversione dell'epitelio cilindrico nell'esocervice con spostamento della giunzione squamocolonnare sul versante vaginale della cervice



L'epitelio cilindrico della mucosa endocervicale everso nell'esocervice subisce modificazioni metaplasiche e gradualmente si trasforma in epitelio squamoso. Questa zona di epitelio squamoso metaplasico è detta “zona di trasformazione”



Nelle donne in postmenopausa, la giunzione squamocolumnare o zona di trasformazione, risale nel canale endocervicale

**Figura 13:** localizzazione della GSC a seconda dell'età e delle varie fasi della vita riproduttiva

Come suggerito da una ampia revisione della letteratura, la percentuale di falsi negativi riscontrabili al pap test è molto variabile (dal 2 al 65% circa) ed è correlata, in particolare, alla ridotta sensibilità del test nel riconoscimento di lesioni di basso grado (CIN I e CIN II) e di quelle associate ad infezione da HPV (65-67). Questo problema è stato in parte risolto con l'adozione della nuova classificazione citologica secondo Bethesda (68).

Il Sistema di Bethesda (TBS), sviluppato nel 1988 e revisionato nel 1991 e nel 2001 (tab. 10), rappresenta, rispetto ai precedenti, un sistema di classificazione più completo che mira:

- ad una più chiara ed univoca interpretazione dei risultati;
- ad escludere i falsi negativi da prelievo inidoneo o da non corretto allestimento del preparato;
- a ottenere una migliore correlazione cito-istologica.



<b>Tipo di campione:</b> specificare se pap test convenzionale, in fase liquida o altro
<b>ADEGUATEZZA DEL CAMPIONE</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- soddisfacente per la valutazione: presenza di cellule cilindriche endocervicali, di componenti della zona di trasformazione</li> <li>- insoddisfacente per la valutazione (presenza di sangue parzialmente oscurante, infiammazione, ecc)</li> <li>- rifiutato non processato (specificare la ragione)</li> <li>- processato ed esaminato ma non soddisfacente per valutare anomalie di cellule epiteliali (specificare la ragione)</li> </ul>
<b>INTERPRETAZIONE DEL RISULTATO</b> <b>Negativo per lesioni intraepiteliali o di malignità</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- organismi: Trichomonas vaginalis, microrganismi fungini, Gardnerella vaginalis, Actinomyces, modificazioni suggestive per Herpes simplex v</li> <li>- modificazioni non neoplastiche: cellule reattive associate a: infiammazione (inclusa la riparazione tipica), terapia radiante, IUD, cellule ghiandolari in paziente isterectomizzata, atrofia.</li> <li>- Altro: cellule endometriali in donne di 40 anni o più</li> </ul>
<b>Anomalie delle cellule epiteliali</b>
<b>Cellule squamose</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- cellule squamose atipiche (ASC), di incerto significato (ASC-US) o che non possono eludere H-SIL (ASC-H)</li> <li>- lesione intraepiteliale di basso grado (L-SIL) comprendente HPV, displasia lieve, CIN 1</li> <li>- lesioni intraepiteliali di alto grado (H-SIL) comprendente displasi moderata e grave, carcinoma in situ, CIN 2, CIN 3, CIS</li> <li>- quadri sospetti per invasione</li> <li>- carcinoma squamoso</li> </ul>
<b>Cellule ghiandolari</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- cellule ghiandolari atipiche (AGC), endometriali o endocervicali, non altrimenti specificate (AGC-NOS), o suggestive di neoplasia (AGC vs. neoplasia)</li> <li>- adenocarcinoma endocervicale in situ (AIS)</li> <li>- adenocarcinoma endocervicale, endometriale, extrauterino o non altrimenti specificato (NOS)</li> </ul>
<b>Altre neoplasie maligne</b>

**Tabella 10:** Bethesda System 2001

Nel TBS la vecchia terminologia di Neoplasia Cervicale Intraepiteliale (CIN), introdotta da Richart nel 1967 ed utilizzata per definire tutte quelle condizioni caratterizzate da graduale proliferazione di cellule atipiche con variabile potenzialità evolutiva verso il carcinoma invasivo, è stata sostituita dal termine SIL (Lesione

Squamosa Intraepiteliale). Il TBS 2001 definisce due livelli di SIL: le SIL di basso (*low*) grado (L-SIL) che comprendono le alterazioni citopatiche (coilocitosi) da Papilloma virus umano (HPV) e le CIN I; e le SIL di alto (*high*) grado (H-SIL), che comprendono le CIN II e III.

La comprensione della storia naturale della CIN comincia solo ora ad emergere dai più recenti studi epidemiologici. Circa l'evoluzione della CIN 1 e delle lesioni da HPV, in letteratura vi sono dati discordanti: regressione spontanea nel 60% dei casi, persistenza nel 30%, progressione a CIN 2-3 nel 10-15% e comparsa di neoplasia invasiva nell'1%, secondo alcuni; progressione da CIN1 a CIN3 nel 7-33% delle pazienti, con intervallo medio della progressione pari a 11-24 mesi, secondo altri; regressione e citologia normale in un periodo di 4 anni o meno in donne con displasia lieve o moderata alla citologia, secondo altri ancora. Circa 1/3 delle displasie di alto grado progredirà nell'arco di 10 anni verso forme di neoplasia invasiva, pertanto risulta di fondamentale importanza lo screening delle lesioni precancerose. La displasia di alto grado, inoltre, insorge in media 26 mesi dopo l'infezione da HPV ad elevato rischio oncogeno anche se la progressione sembra essere correlata al virotipo ed all'attiva proliferazione ed integrazione del DNA virale nella cellula ospite. Infatti, molti studi hanno dimostrato che l'identificazione dell'HPV 16 in donne con lesioni citologiche di basso grado determina la progressione verso la CIN 3 in circa il 60% delle donne entro 14 mesi, mentre in donne con HPV 6 la progressione si verifica solo nel 5% dei casi.

In genere, il rischio di progressione a carcinoma invasivo cresce con il grado della CIN, mentre le lesioni di più basso grado hanno maggiore probabilità di regressione, anche se il comportamento di ogni specifica lesione non è prevedibile.

Inoltre, va sottolineato che tumori invasivi possono insorgere ab initio senza essere preceduti da una fase intraepiteliale.

Per quanto riguarda il comportamento della CIN 3, la letteratura riporta dati più controversi. Ne è stata documentata regressione spontanea nel 32% dei casi e progressione verso il carcinoma invasivo in più del 12%. Altri studi, analizzando periodi di follow-up più lunghi, riportano percentuali di progressione molto più elevate, vicine al 100%. La percentuale di regressione delle lesioni ad elevato rischio è comunque difficile da quantificare poiché, per motivazioni etiche, tali pazienti devono essere trattate.

Un fattore prognostico che condiziona la progressione verso lesioni a più alto grado è la ploidia: si è evidenziato che più dell'85% delle lesioni da HPV e di CIN che regrediscono presenta un pattern di crescita diploide o poliploide, mentre il 95% delle CIN persistenti o che progrediscono presentano aneuploidia (69).

Bisogna, infine, tenere sempre presente che tumori invasivi possono insorgere ab initio senza essere preceduti da una fase intraepiteliale anche se questa evenienza risulta essere abbastanza rara.

È importante essere a conoscenza di cosa accade ad una paziente con CIN iniziale riguardo alla sua storia naturale, poiché è correlato al suo trattamento.

Una revisione della letteratura degli ultimi 40 anni ha indicato che una lesione displasica avanzata (CIN 3) è più probabile che persista o che progredisca rispetto ad un CIN I. Il CIN 3 può regredire spontaneamente, ma è più importante notare che la progressione in un cancro si verifica in oltre il 15% dei casi, mentre un CIN 1 progredisce in un cancro solo nell'1% dei casi. Infine, la regressione e la persistenza del CIN 1 e del CIN 2 sembrano essere simili.



Se potesse essere predetto l'outcome finale di una data paziente con un Pap test patologico, il problema del trattamento potrebbe essere notevolmente semplificato. Certamente non tutte le pazienti con cellule cervicali atipiche sviluppano un cancro della cervice o vanno incontro ad una progressione della CIN. Fino ad oggi non è disponibile alcun metodo per predire quale paziente rimarrà con un CIN, chi progredirà in una forma più severa di CIN o in un cancro invasivo, oppure entro quale periodo di tempo avverrà questa transizione.

L'età media delle pazienti con carcinoma in situ è di 10-15 anni più bassa rispetto all'età media delle pazienti con cancro invasivo della cervice uterina. La displasia di basso grado ha un picco di incidenza nella seconda decade di vita, mentre la displasia di alto grado presenta un picco nella terza decade. Il carcinoma invasivo della cervice è, invece, più spesso riscontrato dopo i 40 anni (70). Tuttavia, esistono molte eccezioni; nell'ultimo ventennio, è stato riportato un numero crescente di pazienti con displasie di grado variabile in giovane età (71).

Nella *nostra casistica* l'età media del carcinoma in situ della cervice è diminuita da circa 40 a 28 anni di età. Ciò potrebbe riflettere sia la maggiore diffusione dell'infezione da HPV tra le adolescenti che la precoce esecuzione dello screening nelle pazienti ad alto rischio. Poiché la maggior parte di queste giovani donne è desiderosa di prole, è importante preservare l'integrità della cervice e dell'utero. Inatti, circa il 30% aveva un'età inferiore o uguale a 20 anni al momento della diagnosi. La nulliparità è stata osservata in circa il 60% della popolazione ed il 30% aveva solo un figlio. Più del 95% delle pazienti aveva avuto rapporti sessuali regolari dall'età di 20 anni e metà era diventata sessualmente attiva a partire dai 16 anni. Più della metà di queste pazienti aveva avuto tre o più partner sessuali. In circa la metà di

queste pazienti la diagnosi di CIN era stata formulata entro 5 anni dall'inizio dell'attività sessuale.

Inoltre, è importante considerare che il carcinoma in situ è solitamente asintomatico e all'esame di routine la lesione non viene frequentemente osservata. Il riconoscimento della lesione si ha soprattutto con l'impiego dell'esame citologico e della colposcopia. La mucosa talvolta sanguina facilmente al contatto ed è relativamente frequente il riscontro di una erosione o di un difetto superficiale dell'esocervice. Pertanto riteniamo che è importante lo screening di queste pazienti ad una età precoce, quando si rivolgono al ginecologo per la contraccezione o per altri motivi medici, un pap-test dovrebbe essere eseguito di routine a prescindere dall'età.

## **Gestione dei risultati dubbi e loro significato in post-menopausa**

Il Bethesda System (TBS) ha introdotto, già nel 1988, il termine ASCUS (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*) (68,72) per indicare anomalie cellulari che possono essere espressione di fenomeni riparativi o infiammatori a carico della cervice oppure essere associate a lesioni preneoplastiche (73).

Le anomalie cellulari, classificabili come ASCUS secondo il TBS, comprendono:

- 1) ingrandimento del nucleo di due o tre volte rispetto a quello di una normale cellula squamosa;
- 2) variazioni di forma e dimensione;
- 3) presenza di lieve ipercromasia, contorni nucleari in genere regolari.

La prevalenza di ASCUS al Pap-test è del 3-10% che si traduce in circa 1.5-5 milioni di casi all'anno nel mondo (74). La percentuale di ASCUS nella popolazione non dovrebbe, tuttavia, essere superiore al 5% dei Pap-test (75). Di qui l'importanza di valutare attentamente le modalità con cui il termine "ASCUS" viene utilizzato, allo scopo di evitarne un uso improprio.

Con un ASCUS citologico la possibilità di avere una diagnosi istologica di CIN o di carcinoma è, rispettivamente, del 5-17% e del 0.2% circa (76). Nel TBS 2001 la categoria viene mantenuta con la terminologia ASC (Anomalie Squamose Cellulari) ma rispetto al TBS 1991, viene suddivisa in ASC-NOS ed ASC-H, ad indicare il sospetto di lesioni intraepiteliali di basso ed alto grado, rispettivamente. Tuttavia,



sono pochi i citologi che adottano questa nuova terminologia, in molti centri è, tutt'ora, estremamente diffuso il termine generico di ASCUS.

Essendo quest'ultimo un referto di dubbio significato, lo sforzo dei citologi è volto a limitarne il più possibile l'impiego. Tuttavia, la letteratura moderna, ha evidenziato che l'incidenza di ASCUS in post-menopausa è estremamente più elevata che in età fertile. Questo, probabilmente, è da mettere in relazione con le variazioni ormonali proprie della menopausa.

L'ipoestrogenismo postmenopausale (livelli di estrogeni circolanti pari a 10-20 pg/ml) è alla base di un processo di progressiva atrofia che si sviluppa a carico di cute, mucose orali e nasali (77), occhio (78) e apparato urogenitale. Il processo atrofico interessa sia l'epitelio che il tessuto connettivo e rende tali tessuti estremamente sensibili ad insulti di vario tipo (traumatici, infettivi, ecc.).

Per quanto riguarda, nello specifico, l'apparato genitale ed, in particolare, la cervice uterina, l'ipoestrogenismo postmenopausale è responsabile della progressiva assenza di maturazione dell'epitelio esocervicale, che perde gli strati superficiali ed intermedio e diviene costituito, quando l'atrofia è completa, da sole cellule di tipo basale. Inoltre, oltre alle modificazioni epiteliali, a livello della portio, si osserva una retrazione del connettivo che induce un vero "entropion" della mucosa endocervicale, con risalita della GSC all'interno del canale cervicale.

Tutti questi cambiamenti influenzano la valutazione citologica e colposcopica delle donne in postmenopausa. In primo luogo lo studio della cervice diviene più difficile a causa dell'atrofia che rende la cervice stessa dura, spesso piccola e meno accessibile all'esame speculare. Il profilo cervicale tende a divenire piatto e l'orifizio esterno stenotico. La fragilità della mucosa fa sì che il minimo traumatismo causi

petecchie o sanguinamenti, elementi che ostacolano ulteriormente l'osservazione. A causa del fisiologico entropion della mucosa endocervicale, la GSC non è generalmente visibile rendendo l'esame colposcopico insoddisfacente (79).

Ma soprattutto, le modifiche a carico degli epiteli creano non pochi problemi interpretativi dei quadri citologici. Ne risulta un incremento di referti citologici anomali, con un aumento della percentuale di ASCUS/L-SIL al Pap-test.

Nella Consensus Conference dell'*American Society for Colposcopy and Cervical Pathology* (ASCCP) del 2001 sul management delle donne con anomalie citologiche cervicali viene sollevato il problema dell'interpretazione delle anomalie citologiche cervicali nelle donne in postmenopausa. Nelle linee guida dell'ASCCP, infatti, la postmenopausa viene definita come una "circostanza particolare" nel corso della quale le anomalie citologiche, nella maggior parte dei casi, non sono realmente predittive di lesioni preneoplastiche (80,81) e questo in relazione alle fisiologiche modifiche che la cervice uterina sviluppa in tale fase della vita di una donna.

Inoltre, le linee guida del 2001 dell'ASCCP riconoscono che una citologia positiva per ASCUS/L-SIL in donne in postmenopausa con una positività per HPV DNA ad alto rischio si associa spesso ad una diagnosi colposcopica e istologica di CIN I-II, con un rischio più elevato di sviluppare lesioni di alto grado negli anni successivi (82). Tali linee guida raccomandano pertanto un adeguato follow-up, in queste pazienti, mediante ripetizione del Pap-test dopo 6 e 12 mesi o dell'HPV DNA test dopo 12 mesi. Ogni anomalia al follow-up richiede la ripetizione dell'esame colposcopico (40).

## Nostra esperienza

Allo scopo di limitare lo stress e le spese legate a lunghi periodi di follow-up, ed evitare overtreatment nelle donne in postmenopausa con citologia positiva per ASCUS e L-SIL, nel nostro studio abbiamo voluto valutare la capacità della terapia estrogenica (*Estrogen Replacement therapy* – ERT) locale di influenzare l'esame citologico e colposcopico.

Gli obiettivi del nostro studio sono stati:

- determinare se l'utilizzo della ERT locale influenza l'adequatezza dell'esame colposcopico;
- differenziare le anomalie citologiche cervicali secondarie ad ipoestrogenismo da quelle dovute a modificazioni preneoplastiche;
- stabilire un adeguato management di ASCUS e L-SIL nelle donne in postmenopausa.

A tale fine sono state selezionate, da una popolazione di 5720 donne in postmenopausa sottoposte a Pap-test per lo screening del cervicocarcinoma, 254 donne con Pap-test positivo per ASCUS (n: 195 = 76.8%) e L-SIL (n: 59 = 23.2%). Sono state escluse dallo studio le donne che effettuavano terapia ormonale sostitutiva (HRT). L'età delle pazienti selezionate era di  $54.9 \pm 5.0$  anni ed il tempo trascorso dalla menopausa di  $73.6 \pm 53.2$  mesi.

Tutte le pazienti arruolate sono state sottoposte ad esame colposcopico eseguito da esperti colposcopisti ed a HPV-DNA test utilizzando test di valutazione *Hybrid Capture II* (Digene Corporation, Gaithersburg, USA).

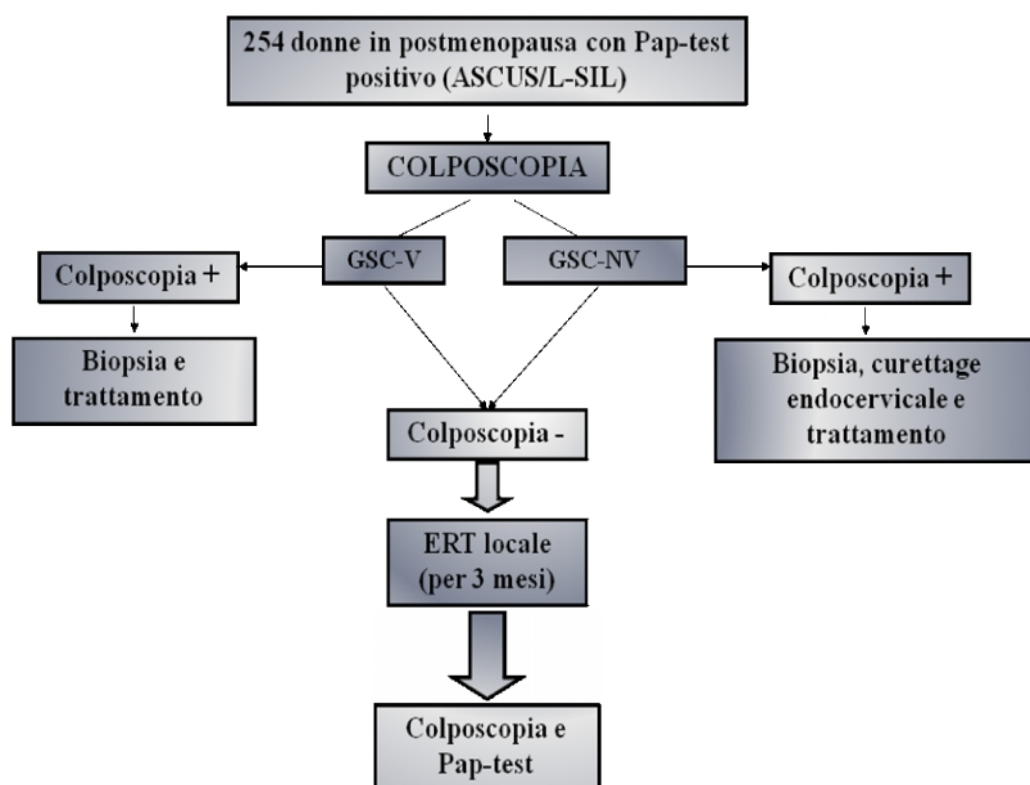


Tutte le pazienti che presentavano una zona di trasformazione atipica tipo 1 o 2 sono state sottoposte a biopsia mirata sotto guida colposcopica e, in caso di colposcopia insoddisfacente, è stato eseguito un curettage del canale cervicale.

Tutte le pazienti con esame istologico positivo (in seguito a biopsia e/o a curettage) sono state sottoposte a trattamento chirurgico personalizzato.

Tutte le pazienti con colposcopia negativa sono state sottoposte a terapia estrogenica locale con Promestriene (Colpotrophine, Theramex, Italia), 1 capsula vaginale al giorno per 20 giorni al mese per 3 mesi. Dopo una settimana, almeno, dal termine del trattamento tali pazienti hanno ripetuto Pap-test e colposcopia (fig. 14).

**Figura 14:** Flow chart diagnostica e terapeutica in donne in postmenopausa con ASCUS/L-SIL

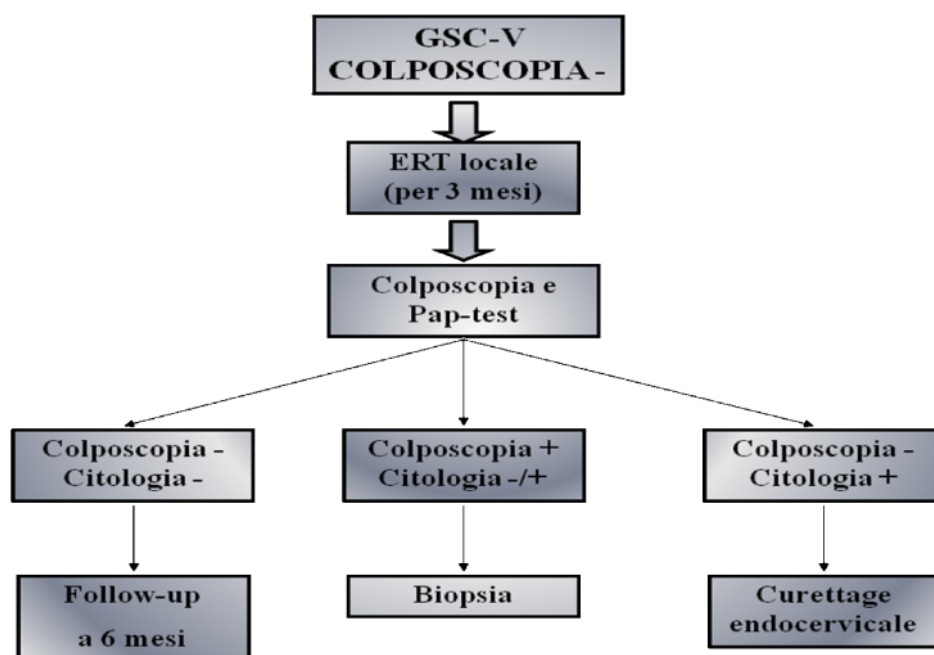


**GSC-V:** Giunzione Squamo-Colonnare Visibile  
**GSC-NV:** Giunzione Squamo-Colonnare Non Visibile  
**ERT:** *Estrogen Replacement Therapy*

Dopo 3 mesi di terapia estrogenica locale, tutte le pazienti con iniziale colposcopia negativa, sono state sottoposte a controllo citologico e colposcopico, distinguendo quelle con GSC visibile alla prima colposcopia (Gruppo A), da quelle con GSC non visibile alla prima colposcopia (Gruppo B).

Nel Gruppo A, le pazienti che, al controllo colposcopico dopo terapia, presentavano colposcopia ancora negativa e citologia divenuta negativa, sono state inviate a follow-up a 6 mesi. Le pazienti che presentavano, invece, colposcopia positiva con citologia positiva o negativa, sono state sottoposte a biopsia cervicale mirata. Infine, le pazienti che presentavano ancora colposcopia negativa e citologia positiva, sono state sottoposte a curettage endocervicale (fig.15).

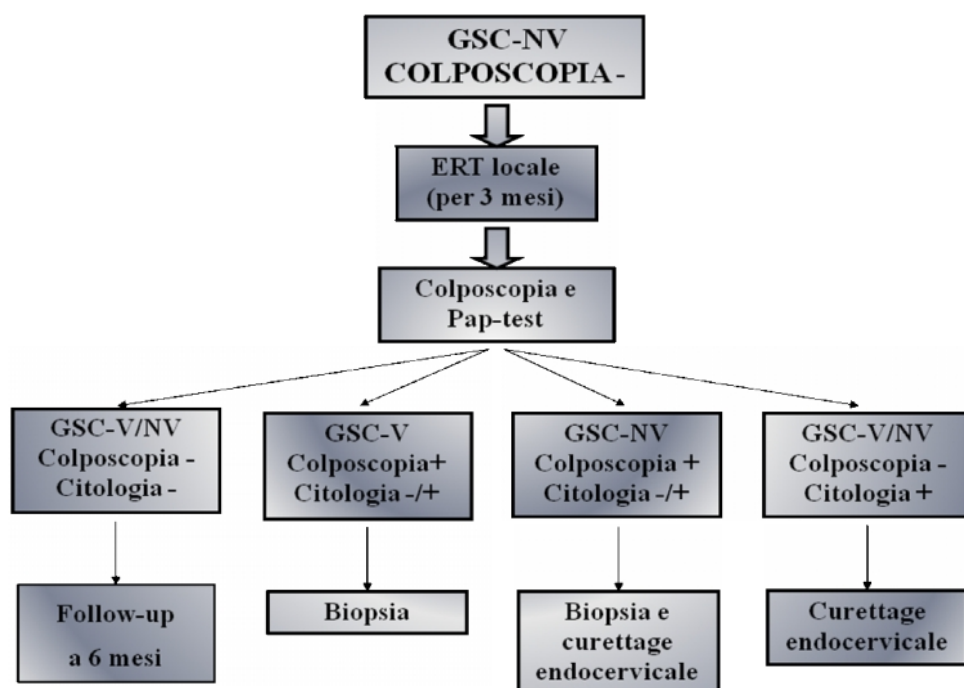
**Figura 15:** Flow chart diagnostica e terapeutica in donne in postmenopausa con ASCUS/L-SIL, colposcopia negativa e GSC-V (Gruppo A).



GSC-V: Giunzione Squamo-Colonnare Visibile  
 GSC-NV: Giunzione Squamo-Colonnare Non Visibile  
 ERT: *Estrogen Replacement Therapy*

Nel gruppo B, le pazienti che, al controllo colposcopico dopo terapia, presentavano colposcopia ancora negativa, con GSC visibile o non visibile e citologia divenuta negativa, sono state inviate a follow-up a 6 mesi. Le pazienti con colposcopia positiva e GSC visibile, indipendentemente dal risultato dell'esame citologico, sono state sottoposte a biopsia cervicale mirata. Le pazienti con colposcopia positiva e GSC non visibile, indipendentemente dal risultato dell'esame citologico, sono state sottoposte a biopsia mirata esocervicale e curettage endocervicale. Infine, le pazienti con colposcopia negativa e citologia ancora positiva, indipendentemente dall'adeguatezza della colposcopia sono state sottoposte a curettage endocervicale (fig.16).

**Figura 16:** Flow chart diagnostica e terapeutica in donne in postmenopausa con ASCUS/L-SIL, colposcopia negativa e GSC-NV (Gruppo B).



GSC-V: Giunzione Squamo-Colonnare Visibile  
 GSC-NV: Giunzione Squamo-Colonnare Non Visibile  
 ERT: *Estrogen Replacement Therapy*

Tra le 254 pazienti arruolate e sottoposte all'HPV DNA test per la ricerca di istotipi ad alto rischio, 72 sono risultate positive, di queste 37 appartenevano al gruppo degli ASCUS (18.9%) e 35 a quello delle L-SIL (59.3%).

Nel corso della prima colposcopia, 39 delle 254 pazienti arruolate (7 del gruppo ASCUS e 32 del gruppo L-SIL) hanno mostrato una lesione cervicale e sono state, pertanto, sottoposte a biopsia con o senza curettage endocervicale, e successivamente a trattamento chirurgico adeguato; le restanti 215 pazienti con colposcopia negativa, sono state trattate con terapia estrogenica locale per 3 mesi (tab. 11). Inoltre, alla prima valutazione colposcopica, 71 delle 254 colposcopie (27.9%) erano risultate soddisfacenti e 183 (72.0%) insoddisfacenti. Centosettantotto di queste 183 pazienti presentavano una colposcopia negativa e sono state sottoposte a ERT locale (tab. 11).

Dopo ERT locale, 23 delle 215 pazienti (3 del gruppo ASCUS e 20 del gruppo L-SIL) hanno presentato, al controllo colposcopico, una lesione cervicale e sono state, pertanto, sottoposte a biopsia con o senza curettage endocervicale, e successivamente a trattamento adeguato che è risultato chirurgico per 22 di queste e medico per 1 sola paziente, con ASCUS iniziale, il cui esame istologico ha evidenziato una paracheratosi. Inoltre, dopo ERT locale, delle 178 pazienti con colposcopia insoddisfacente negativa, 130 (73.0%) pazienti presentavano una colposcopia soddisfacente (tab. 12).



**Tabella 11:** Risultati della prima valutazione colposcopica di 254 donne in postmenopausa con pap-test positivo per ASCUS/L-SIL

	GSC-V <sup>1</sup>		GSC-NV <sup>2</sup>		TOTALE	
	ASCUS	L-SIL	ASCUS	L-SIL		
Colposcopia Positiva	5	29	2	3	39	
Colposcopia Negativa	29	8	159	19	215	ERT <sup>3</sup> LOCALE
TOTALE	71		183		254	

**Tabella 12:** Risultati della valutazione colposcopica delle 215 pazienti sottoposte a terapia estrogenica locale

	PRIMA dell'ERT <sup>4</sup>	DOPO l'ERT locale
GSC-V <sup>5</sup>	37	167
GSC-NV <sup>6</sup>	178	48
ASCUS	188	22 Lesioni Trattate Chirurgicamente
L-SIL	27	

<sup>1</sup> GSC-V: Giunzione Squamo Colonnare Visibile.

<sup>2</sup> GSC-NV: Giunzione Squamo Colonnare Non Visibile.

<sup>3</sup> ERT: Estrogen Replacement Therapy.

<sup>4</sup> ERT: *Estrogen Replacement Therapy*

<sup>5</sup> GSC-V: Giunzione Squamo Colonnare Visibile.

<sup>6</sup> GSC-NV: Giunzione Squamo Colonnare Non Visibile.

Complessivamente, sul totale delle 254 pazienti con Pap-test anomalo all'inizio dello studio, sono stati richiesti 62 esami istologici (24.4% delle pazienti) in seguito a biopsia mirata e/o curettage endocervicale. Cinquantadue delle 59 pazienti con iniziale L-SIL (88.1%) sono state trattate per lesioni patologiche, mentre solo 9 delle 195 con iniziale ASCUS (4.6%) sono state sottoposte ad intervento chirurgico. Una sola paziente con ASCUS iniziale, ha ricevuto trattamento medico. In 39 pazienti è stata fatta diagnosi di CIN I e le stesse sono state sottoposte a laservaporizzazione della cervice sotto guida colposcopica. In 14 è stata, invece, fatta diagnosi di CIN II in seguito a biopsia e le stesse sono state sottoposte a LEETZ (*Large Loop Excision of the Transformation Zone*). Infine, 2 pazienti con CIN III, 5 pazienti con CIN II endocervicale e 1 paziente con CIN III endocervicale sono state sottoposte a conizzazione a lama fredda.

Tutte le procedure chirurgiche sono state effettuate con successo, è stato possibile identificare correttamente i margini dell'escissione su tutti i campioni istologici e l'esame istologico ha mostrato margini liberi da neoplasia in tutti i casi.

Inoltre, tutte le pazienti trattate chirurgicamente (in totale 61) rientravano nel gruppo di quelle positive all'HPV DNA test all'inizio dello studio.

Queste sono state le nostre conclusioni.

Le principali metodiche utilizzate per la diagnosi precoce di neoplasie cervicali (Pap-test e colposcopia) presentano, in postmenopausa, notevoli limiti. L'ipoestrogenismo postmenopausale, infatti, determina alterazioni del normale trofismo della mucosa cervicale che, da una parte, impediscono la corretta esecuzione delle indagini diagnostiche e, dall'altra, influenzano l'interpretazione dei risultati cito-istologici. Per tali motivi e per la minore diffusione dello screening in

questa fascia di età, le donne in postmenopausa presentano un rischio aumentato di sviluppare un carcinoma cervicale invasivo (79-82).

È ormai ben consolidato il dato che indica un maggior numero di ASCUS citologici nelle donne in postmenopausa rispetto a quelle in premenopausa. Tuttavia, il nostro studio, ha dimostrato che in postmenopausa una citologia positiva per ASCUS ha un basso valore predittivo positivo per lesioni neoplastiche.

Secondo il Bethesda System si fa diagnosi di ASCUS quando sono presenti una o due delle anomalie nucleari che caratterizzano una SIL (ingrandimento del nucleo, ipercromasia nucleare, irregolarità della membrana nucleare) (68). Tuttavia, in postmenopausa, un lieve ingrandimento del nucleo è relativamente comune, ma raramente è associato con anomalie istologiche significative (72) ed è imputabile, soprattutto, alle modificazioni atrofiche della cervice. Questo giustificherebbe proprio l'aumentato numero di ASCUS nelle donne in postmenopausa rispetto alle donne in età fertile (83).

Nel nostro studio la maggior parte degli ASCUS citologici non è associata all'evidenza di lesioni displastiche ma sembra correlata alle modificazioni atrofiche indotte dall'ipoestrogenismo e come tale sembra regredire dopo terapia estrogenica locale. Infatti, solo 9 dei 195 ASCUS iniziali (4.6%) sono stati sottoposti a trattamento chirurgico contro le 52 delle 59 L-SIL iniziali (88.1%) per le quali è stata riconosciuta una lesione patologica trattata chirurgicamente.

In particolare, dopo ERT locale, 2 dei 188 ASCUS (1.06%) e 20 delle 27 L-SIL (74.0%) hanno ricevuto un trattamento chirurgico in seguito ad esame istologico positivo. Dopo ERT locale, sono state riscontrate complessivamente 10 H-SIL

istologiche che sono state poi trattate chirurgicamente e che si è visto erano appartenenti a donne con citologia iniziale positiva per L-SIL.

In accordo con i dati presenti in letteratura (80), noi abbiamo riscontrato che l'ERT locale può fornire un aiuto nell'identificare le reali anomalie citologiche nelle donne in postmenopausa, correggendo le alterazioni cellulari indotte dall'ipoestrogenismo.

Di contro, altri studi hanno rilevato che la terapia ormonale sostitutiva (HRT), per via sistemica, si associa ad artefatti citologici che mimano una L-SIL (84), inoltre l'HRT può determinare un'iperpressione virale con conseguente alto rischio di tumori della sfera genitale (85-87). Tali dati, in disaccordo con i nostri risultati, richiederebbero ulteriori approfondimenti in merito al tipo di terapie, ai dosaggi ed ai tempi di somministrazione.

Come esposto precedentemente, anche l'esame colposcopico può essere inficiato dall'ipoestrogenismo. Infatti, a causa delle modificazioni ormonali, la GSC può non essere visualizzabile, il che rende la colposcopia insoddisfacente. All'inizio del nostro studio, solo 71 donne (27.9%) presentavano una colposcopia soddisfacente mentre in 183 (72.1%) essa risultava insoddisfacente. Di queste ultime, 178 presentavano una colposcopia negativa e iniziavano l'ERT locale. Al controllo colposcopico dopo la terapia, 130 di queste 178 (73%) presentavano una colposcopia soddisfacente.

Già precedenti studi hanno valutato l'influenza della terapia estrogenica sull'adeguatezza dell'esame colposcopico. In un trial clinico controllato, randomizzato, in doppio cieco, 36 donne con discariosi al Pap-test e colposcopia insoddisfacente, sono state selezionate in maniera random per ricevere 30 µg di



etinilestradiolo o placebo, per 10 giorni. Dopo tale periodo, la colposcopia risultava soddisfacente in una percentuale significativamente maggiore nel gruppo di donne trattate con estradiolo rispetto al gruppo trattato con placebo (70% contro 23%) (88). In uno studio più recente, Milam et al. hanno valutato gli effetti della contraccezione ormonale sull'adeguatezza dell'esame colposcopico. In tale studio, si è visto che sia l'età che la contraccezione ormonale influenzano l'adeguatezza della colposcopia (89).

Nel nostro studio abbiamo, inoltre, valutato l'entità della correlazione tra infezione da HPV e anomalie citologiche in postmenopausa. All'inizio dello studio, avevamo riscontrato una positività all'HPV DNA test in 72 delle 254 pazienti arruolate (28.3%), di cui 37 appartenenti al gruppo degli ASCUS (18.9%) e 35 al gruppo L-SIL (59.3%). Dal nostro studio emerge che tutte le pazienti con ASCUS o L-SIL iniziale che sono state sottoposte a trattamento chirurgico nel corso dello studio (prima o dopo l'ERT locale), presentavano un HPV DNA test positivo all'inizio dello studio. La positività al test sembrerebbe, pertanto, correlata con una maggiore evidenza di lesioni cervicali, ma sarebbe necessario un follow-up prolungato per valutare, in queste pazienti HPV positive, il rischio effettivo di progressione delle lesioni verso la displasia severa.

L'incidenza di HPV tra i nostri ASCUS è risultata simile a quella riportata in altri studi. Johnson et al. hanno affermato che il riscontro dell'HPV DNA alla citologia cervicale è inversamente correlato con l'età delle pazienti. Tali autori hanno rilevato che, in postmenopausa la diagnosi citologica di ASCUS corrisponde, in un'alta percentuale di pazienti, ad un HPV DNA negativo; il test risultava positivo, infatti solo nel 18% dei casi, nel gruppo di donne con età superiore a 50 anni (90). Risultati

simili sono stati ottenuti da Moss et al., che hanno riportato una percentuale di positività all'HPV DNA test del 16.2% nel gruppo di donne con ASCUS citologico di età compresa tra i 50 ed i 64 anni (91).

Un cenno va inoltre, fatto al rapporto costi/benefici dell'HPV DNA test. Uno studio condotto nel 2002 ha riscontrato che l'utilizzo del test per i sottotipi virali ad alto rischio, in tutte le pazienti con ASCUS citologico, presenta un rapporto costi/benefici migliore rispetto ad altre strategie di management (92).

Nella nostra Unità di Colposcopia, dove non è applicabile di routine l'HPV DNA test, al fine di identificare i falsi positivi e di stabilire un corretto management, abbiamo voluto testare in che modo un singolo ciclo (della durata di 3 mesi) di ERT locale incide sulla adeguatezza dell'esame colposcopico e sulla attendibilità dell'esame citologico.

In conclusione, una ERT locale di breve durata, seguita da un adeguato follow-up citologico e colposcopico, ci ha consentito di ottenere buoni risultati, in termini diagnostici e terapeutici, nelle donne in postmenopausa con citologia positiva per ASCUS/L-SIL mantenendo costi limitati ed evitando over-treatment. Infatti, con un singolo ciclo di ERT locale è possibile distinguere le lesioni cervicali benigne legate all'atrofia dalle lesioni pre-neoplastiche. Inoltre, la terapia estrogenica è frequentemente responsabile dell'ectropion delle cellule endocervicali, rendendo visibili gran parte delle GSC che non lo erano, prima del trattamento. Si va, in tal modo, a ridurre significativamente il numero di procedure diagnostiche e terapeutiche invasive (curettage endocervicale, escissioni con ansa diatermica, conizzazioni a lama fredda) che si rendono necessarie nella gestione delle pazienti con colposcopia inadeguata.

Quindi, i nostri risultati supportano l'ipotesi che ASCUS e L-SIL, in postmenopausa, necessitano di una flow-chart diagnostica differente e più specifica, rispetto a quanto accade in pre-menopausa. Tuttavia, sarebbero necessari studi su un maggior numero di soggetti e periodi di follow-up più lunghi per confermare questa conclusione.

# Atypical squamous cells and low squamous intraepithelial lesions in postmenopausal women: Implications for management

Roberto Piccoli, Vincenzo D. Mandato\*, Giada Lavitola, Giuseppe Acunzo, Giuseppe Bifulco, Giovanni A. Tommaselli, Wanda Attianese, Carmine Nappi

Department of Obstetrics and Gynaecology, Unit of Cervical and Vaginal Pathology, University of Naples “Federico II”, Naples, Italy

Received 18 December 2006; received in revised form 10 April 2008; accepted 28 May 2008

## Abstract

**Objectives:** To determine whether the use of local Estrogen Replacement Therapy (ERT) affects the adequacy of colposcopic examination; to distinguish abnormal cervical smears secondary to hypoestrogenism from abnormal cervical smears due to true preneoplastic changes; and to suggest an effective management of atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) and low grade squamous intraepithelial lesion (L-SIL) in menopausal women.

**Study design:** Two-hundred fifty-four postmenopausal women with abnormal pap smears (L-SIL or ASCUS) underwent colposcopy and HPV DNA testing. All patients with positive colposcopy underwent punch biopsy, and all patients with positive histological findings underwent surgical treatment. Patients with negative colposcopy, both satisfactory [visible Squamo-Columnar Junction (SCJ)] and unsatisfactory, were treated with local estrogenic replacement therapy (ERT) for 3 months, and repeated colposcopy and pap smears. Patients with negative colposcopy and negative pap smears after ERT were included in a 6 months cytological and colposcopic follow-up. Patients with positive colposcopy underwent punch biopsy, if colposcopy was negative and cytology was positive, patients underwent endocervical curettage.

**Results:** One-hundred ninety-five had a diagnosis of ASCUS and 59 a diagnosis of L-SIL. At the first colposcopy, 39 patients showed a lesion and had an appropriate treatment. One-hundred eighty-eight in the ASCUS group and 27 in the L-SIL group had a negative colposcopy and were treated with local ERT. At first colposcopic examination, 37 of the 215 negative colposcopies resulted satisfactory and 178 of the 215 resulted unsatisfactory. After local ERT, 130 of the 178 patients had a satisfactory follow-up colposcopy. After ERT, 25 patients of 215 with initial abnormal CVS and negative colposcopy, required appropriate treatment. After ERT, 190 patients of 215 showed negative colposcopy and at cytologic follow-up showed 23 ASCUS and 167 normal CVS.

**Conclusions:** A correct diagnosis and an efficient treatment seem to be obtained with a short-time ERT followed by a short-time cytological and colposcopic follow-up. With a single course of local ERT it may be possible to distinguish between benign CVS mimicking atrophy and true preneoplastic changes. Estrogen therapy will often cause enough ectropion of the endocervical cells so that the entire SCJ can be visualized. Moreover, it may reduce the number of endocervical curettage or loop excision or cone procedure for women with inadequate colposcopic examination.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** ASCUS; LSIL; ERT; Menopause

## 1. Introduction

The term “atypical squamous cells of undetermined significance” (ASCUS) was introduced in the 1988 Bethesda System to categorize cellular abnormalities found in cervico-vaginal smears (CVS) [1,2]. The prevalence of ASCUS in CVS is 3–10%; and should not exceed the percentage of 5% of pap smears [3].

\* Corresponding author at: Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Naples “Federico II”, Via Pansini 5, 80131, Naples, Italy. Tel.: +39 081 7462905; fax: +39 081 7462905.

E-mail address: [dariomandato@virgilio.it](mailto:dariomandato@virgilio.it) (V.D. Mandato).



ASCUS diagnostic criteria include: bland nuclear enlargement (2–3-fold the area of squamous cells nuclei), smooth nuclear membranes, nuclear hyperchromasia, cellular shape and dimension changes. These cytological abnormalities are characterized by epithelial changes associated with reactive/inflammatory processes, sampling artefacts, or squamous intraepithelial lesions (SIL) [4]. Indeed, ASCUS diagnosis at CVS may indicate the presence of histological lesions ranging from cervical intraepithelial neoplasia (CIN) I to cancer in 5–17% and 0.2% of cases, respectively [5].

CIN are well-recognized neoplastic precursors, and the progression towards invasive cervical cancer is directly related to the grade of the lesion (CIN I < CIN II < CIN III) [6].

Persistent infection with carcinogenic types of human papilloma virus (HPV) seems to be an important factor in the development of CIN and progression to cancer [7–10]. HPV may become latent and be reactivated if immune surveillance decreases [11].

Two peaks in the prevalence of infections with carcinogenic HPV have been identified: the first among women under 25 years and the second among women over 59 years [12].

The 2001 American Society for Colposcopy and Cervical Pathology management guidelines recognize that women who have lesions <CIN II as the colposcopic/pathologic diagnosis at their first colposcopic evaluation for low grade SIL (L-SIL) or HPV-positive ASCUS pattern, show an elevated risk for more severe disease detection over the next few years [13]. Follow-up is recommended by either repeated cytology after 6 and 12 months, or high risk-HPV testing after 12 months, and any abnormal result during follow-up requires repeated colposcopic examination [13].

As reported in the 2001 Consensus Guidelines for the Management of Women with Cervical Cytological Abnormalities, postmenopausal women represent a “special circumstance”, because abnormal CVS may not necessarily be predictive of a preneoplastic lesion [14,15].

Postmenopausal hypoestrogenism is followed by atrophic changes in the urogenital tract which may affect both the cytologic and the colposcopic evaluation. Indeed, postmenopausal hormonal changes may increase atypical CVS as well as ASCUS/L-SIL ratio. In addition, due to hypoestrogenism, the Squamo-Columnar Junction (SCJ) may often not be visualized, thus making the colposcopic examination unsatisfactory [16].

Since older women are at higher risk of invasive cervical carcinoma [11], both the prevalence and significance of CVS abnormalities associated with viral changes and dysplasia in postmenopausal women have to be clarified, in order to identify women at actual risk of developing invasive cervical cancer.

The aim of the present study was to determine whether the use of local Estrogen Replacement Therapy (ERT) may affect the adequacy of colposcopic examination. Moreover,

we aimed at evaluating whether ERT may reduce the ASCUS diagnosis, thus allowing distinguishing between benign mimics of atrophy and true preneoplastic changes.

## 2. Materials and methods

The study was carried out at the Unit of Colposcopy of the University of Naples “Federico II”. Between January 1998 and February 2006, 254 postmenopausal women (age:  $54.9 \pm 5.0$  years; time since menopause:  $73.61 \pm 53.2$  months) with abnormal pap smears [(195 ASCUS (76.8%), and 59 L-SIL (23.2%)] were recruited from a population of 5720 postmenopausal women who underwent cervicovaginal smears (CVS) for screening purpose. Women on hormonal replacement therapy (HRT) were excluded from the study.

All CVS were ThinPrep® Pap Tests™ (Cytec Corp., Boxborough, MA, USA) and were interpreted following the 1991 Bethesda System [17].

All women underwent a colposcopic examination by an experienced colposcopist (R.P.) and the HPV DNA testing using the Hybrid Capture II (HC2) assay (Digene Corporation, Gaithersburg, MD, USA) with Residual PreservCyt (Cytec Corporation) cytology aliquots. This assay targets 13 oncogenic HPV Types (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) and identify HPV positive or HPV negative (for any of the oncogenic types) specimens.

Colposcopic examination was performed after a 5% acetic acid solution application to the cervix. The examination was considered satisfactory when the entire Squamo-Columnar Junction and the margin of any visible lesion could be visualized with the colposcope. A colposcopy was considered positive when a flat or slightly elevated, mostly well demarcated, aceto-reactive lesion, a punctuate capillary pattern or a mosaic pattern could be found after acetic acid application. Colposcopies were defined non-satisfactory if SCJ was not visible during the examination.

All patients showing an acetoreactive lesion with a visible SCJ, underwent a punch-targeted biopsy, while patient with an acetoreactive lesion and a non-visible SCJ underwent also an endocervical curettage.

All patients with positive histological findings (punch biopsy and/or endocervical curettage) underwent a surgical treatment tailored to the definitive colposcopic as well as histological findings.

All patients with negative colposcopy underwent local ERT with Promestriene (Colpotrophine, Theramex), 1 vaginal capsule/day for 20 days for 3 months. After treatment, they were scheduled for a new pap smear and a further colposcopic examination (1 week after the last estrogen application) (Fig. 1).

In the group of patients showing a visible SCJ at the first colposcopic examination, if the colposcopy resulted positive after 3 months of ERT, a biopsy was performed (Fig. 2). If both

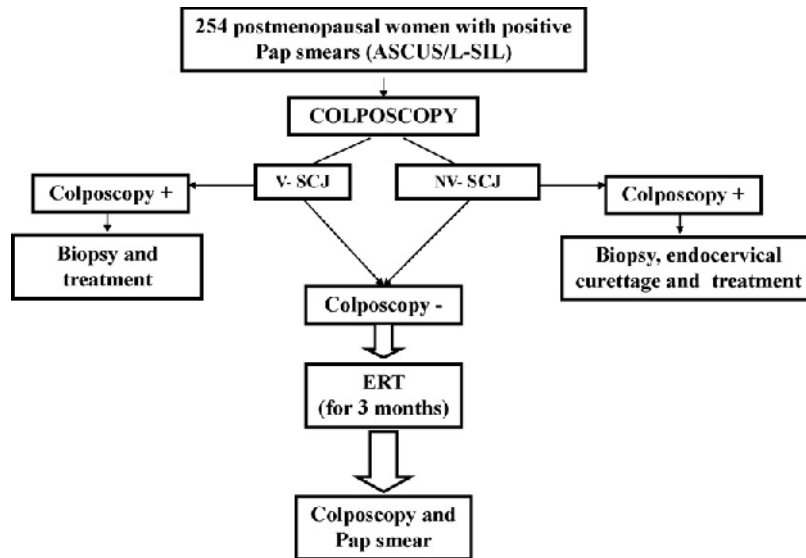


Fig. 1. Diagnostic and therapeutic flow chart in postmenopausal women with ASCUS and L-SIL. V-SCJ: visible Squamo-Columnar Junction; NV-SCJ: non-visible Squamo-Columnar Junction; ERT: Estrogen Replacement Therapy.

colposcopy and cytology were negative, patients underwent colposcopic and cytologic follow-up after 6 months (Fig. 2). Finally, if colposcopy was negative and cytology was positive, an endocervical curettage was performed.

In the group of patient showing no visible SCJ (Fig. 3) at the beginning of the study, if the colposcopy was positive after 3 months of ERT, a biopsy was performed; conversely, if SCJ was still non-visible, an endocervical curettage was also performed. If colposcopy was negative with a non-visible SCJ and a negative cytology, patients underwent

colposcopic and cytologic follow-up after 6 months. Finally, if colposcopy was negative with a visible or non-visible SCJ and a positive pap smear, patients underwent endocervical curettage.

### 3. Results

Two-hundred fifty-four women with abnormal CVS were consecutively recruited over a period of 8 years. One-

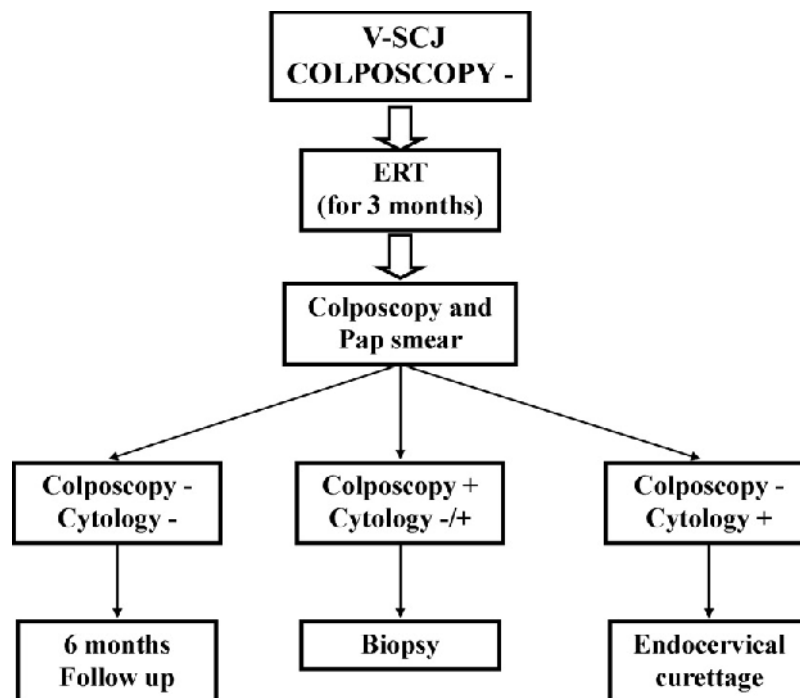


Fig. 2. Diagnostic and therapeutic flow chart in postmenopausal women with ASCUS and L-SIL with negative colposcopy and visible SCJ. V-SCJ: visible Squamo-Columnar Junction; NV-SCJ: non-visible Squamo-Columnar Junction; ERT: Estrogen Replacement Therapy.

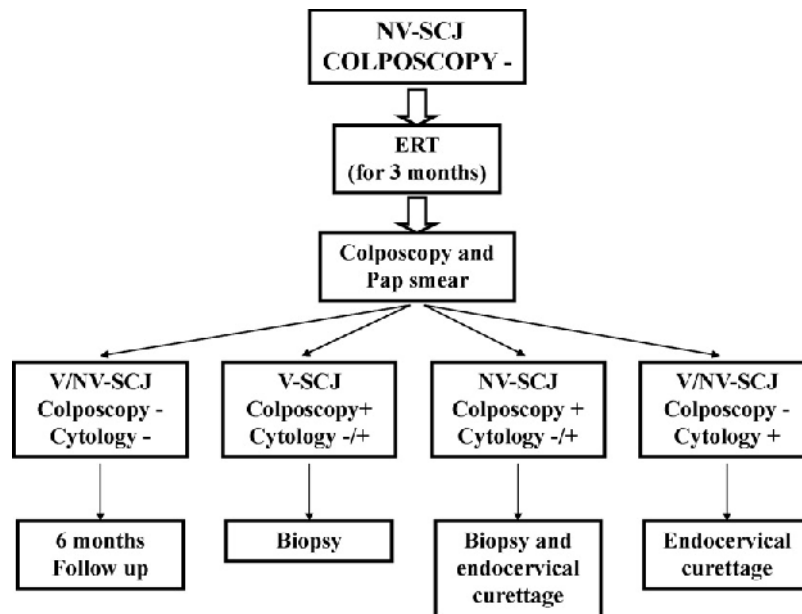


Fig. 3. Diagnostic and therapeutic flow chart in postmenopausal women with ASCUS and L-SIL with negative colposcopy and non-visible SCJ. V-SCJ: visible Squamo-Columnar Junction; NV-SCJ: non-visible Squamo-Columnar Junction; ERT: Estrogen Replacement Therapy.

hundred ninety-five of them (76.8%) had a diagnosis of ASCUS and 59 (23.2%) a diagnosis of L-SIL.

Seventy-two out of these 254 patients had a positive HPV DNA test, which was associated in 17 (8.7%) cases with an ASCUS diagnosis and in 55 (93.2%) women with a L-SIL diagnosis.

At the first colposcopy, 39 patients (7 from the ASCUS group and 32 from the L-SIL group) showed a lesion requiring a biopsy and/or endocervical curettage and an appropriate surgical treatment.

Two-hundred fifteen patients (188 in the ASCUS group and 27 in the L-SIL group) had a negative colposcopy and were treated by local ERT (Table 1).

At first colposcopic examination, 37 (17.2%) out of the 215 negative colposcopies resulted satisfactory and 178 (82.8%) unsatisfactory. After local ERT, 130 (73%) of the 178 patients had a satisfactory follow-up colposcopy (Table 2).

After ERT, 25 out of 215 patients (5 from the ASCUS group and 20 from the L-SIL group) with initial abnormal CVS and negative colposcopy (Table 3), were diagnosed at cytologic follow-up as having a lesion which was a H-SIL in 10 women (8 in L-SIL group and 2 in ASCUS group) and a

L-SIL in 13 patients (12 in L-SIL group and 1 in ASCUS group). At the colposcopic follow-up examination whether the lesions were visible or not, patients underwent a target biopsy or an endocervical curettage. Histologic examination of ASCUS group revealed 2 CIN II, 1 CIN I, 1 paracheratosis and 1 chronic cervicitis; histologic examination of L-SIL group revealed 2 CIN III, 6 CIN II, 9 CIN I and 3 HPV. All patients received appropriate treatment: paracheratosis and chronic cervicitis underwent medical therapy; CIN II-III lesions were treated with surgical conization/LEETZ; CIN I and HPV were treated by laservaporization of cervix under colposcopic guide. All surgical procedures were successful, with no procedures producing a histological specimen with involved margins.

Table 2

Satisfactory colposcopic evaluation before and after ERT of 215 patients with abnormal CVS

	Before local ERT	After local ERT
V-SCJ	37	167
NV-SCJ	178	48

V-SCJ: Visible Squamo-Columnar Junction.

NV-SCJ: Non-Visible Squamo-Columnar Junction.

ERT: Estrogen Replacement Therapy.

Table 1

Initial evaluation of the 254 postmenopausal women

ERT treatment	V-SCJ		NV-SCJ		Total
	ASCUS	L-SIL	ASCUS	L-SIL	
Positive colposcopy	5	29	2	3	39
Negative colposcopy	29	8	159	19	215
Total	71		183		254

V-SCJ: Visible Squamo-Columnar Junction. NV-SCJ: Non-Visible Squamo-Columnar Junction. ERT: Estrogen Replacement Therapy.

Table 3

Colposcopic evaluation before and after ERT of 215 patients with abnormal CVS

	Before local ERT (negative colposcopy)	After local ERT (positive colposcopy)
ASCUS	188	5
L-SIL	27	20

ERT: Estrogen Replacement Therapy.

All 62 surgically treated patients had a positive HPV-DNA test at the first evaluation.

At the follow up after ERT, 190 out of 215 patients showed negative colposcopy while 23 ASCUS and 167 normal CVS were obtained. ASCUS patients underwent colposcopic and cytologic follow-up after 6 months.

#### 4. Comment

Postmenopausal women are at increased risk for invasive cervical cancer. The notion that cervical cancer has a trend toward increasing stage with increasing age has suggested that screening programmes in older patients do not perform as efficiently as in younger women [11,17].

In the postmenopausal period, the most common diagnostic tools (Pap smear and colposcopy) used for the diagnosis of CIN have several limitations. Postmenopausal hypoestrogenism is followed by atrophic changes in urogenital female tract, such as the involution of cervical tissue. A common finding in postmenopausal women is an increase in the number of diagnosis of ASCUS with a higher ASCUS/L-SIL ratio. In our study ASCUS/L-SIL ratio was 3.3. However, in postmenopausal women ASCUS has a low positive predictive value. Commonly, ASCUS is diagnosed when one or two of the nuclear features of SIL (nuclear hyperchromasia, irregular membranes and enlargement) are present (1). Traditionally, mature squamous cells with enlarged nuclei have been classified as ASCUS. However, in postmenopausal women, as opposed to younger women, this bland nuclear enlargement is relatively common and rarely associated with a significant histologic abnormality (2). This bland nuclear enlargement due to atrophic changes might be the cause of the increased number of ASCUS diagnosis in menopause [9].

In our study most ASCUS CVS were not associated with a high-grade lesions at targeted biopsy. Indeed, a large percentage of ASCUS pattern seemed to regress if atrophic changes due to hypoestrogenism were counterbalanced by an adequate estrogenic therapy. Fifty-two women out of 59 (88.1%) in the L-SIL group were surgically treated for pathologic lesions, while only 10 out of 195 (5.1%) cases of ASCUS pap-smears received a surgical treatment.

In particular, after local ERT, three out of 188 cases (1.6%) of ASCUS and 20 out of 27 (74%) L-SIL cases had histologic abnormalities and received a surgical treatment. After local ERT, ten “histologic” H-SIL cases (5.3%) were found and surgically treated.

In a similar study, follow-up after local ERT in 84 patients revealed ten cases of SIL (12%) [8 (9.5%) were LSIL and 2 (2.4%) were HSIL] and nine cases of ASCUS (11%), six of which were diagnosed as reactive lesions [18].

As for ASCUS-L-SIL CVS, atrophic vaginitis may affect the diagnosis of invasive squamous cell carcinoma (SCC) [19,20]. Selvaggi et al. [20] reported 33 cases of atrophic vaginitis showing a heavy background of granular material

containing acute inflammatory cells, apoptotic bodies, and fresh/crenated red blood cells that were indistinguishable from those reported in five cases of invasive SCC.

As suggested by the literature [14], we agree that a course of local ERT may be helpful in differentiate cytological diagnosis in postmenopausal women. ERT may induce a decrease of degenerated cellular changes and the presence of a clean background.

On the other hand, several evidences showed that HRT is associated with artefacts in Pap smears mimicking L-SIL caused by cellular glycogenization [21] and that HRT may up-regulate viral expression with subsequent higher risk of genital cancer [22–24].

In our study, HPV test was positive in 72 (28%) out of 254 patients, 17 (8.7%) of which were diagnosed as having ASCUS and 55 (93.2%) L-SIL. In literature, Johnston and Logani [25] stated that HPV-DNA detection in CVS has an inverse relation to patient age. ASCUS diagnosis in postmenopausal women result in a negative HPV-DNA test in a significant proportion of patients. HPV-DNA test was positive in 18% cases in the group of women over 50 years [25]. Similar results were observed by Moss et al. [26], who reported a HPV-positive rate for ASCUS of 16.2% in the group ages 50–64 years.

However, in our study, all treated ASCUS/L-SIL patients had a positive HPV-test at the initial evaluation. Positive HPV-test seems to correlate with an higher number of CIN lesions, but longer follow-up is needed to confirm the risk of progression towards severe dysplasia of HPV positive patients.

As previously reported, colposcopic examination may also be impaired by hypoestrogenism. Because of the hormonal changes, SCJ may not be visualized and thus the colposcopic examination may be unsatisfactory.

In our study, ERT improved satisfactory colposcopy from 27.9% to 79.1% (Table 2). Particularly, after local ERT, 130 (73%) patients presented a satisfactory follow-up colposcopy.

Previous studies also evaluated whether the use of estrogen therapy affects the adequacy of colposcopic examination. In a randomized, double-blind placebo controlled trial, 36 women with dyskaryotic CVS and unsatisfactory colposcopy were randomly allocated to receive either 30 mg of ethinyl-oestradiol or placebo daily for 10 days. Colposcopy was satisfactory in a significant greater proportion of the group treated by estrogen (70% vs. 23%) [27]. In a more recent study, Miliam et al. [28] proved the effect of the hormonal contraception on the adequacy of colposcopic examination. The multivariate logistic regression analysis showed that both age and hormonal contraception use significantly influenced the adequacy of colposcopy.

Even though a study performed in 2002 found that HPV testing for high risk DNA types for all ASC-US CVS using liquid based cytology is more cost-effective than other management strategies [29], in our colposcopic unit, as the



HPV-DNA test is not routinely performed, we prefer to administer a single course of local ERT in postmenopausal patients with equivocal CVS and unsatisfactory colposcopy.

Although the lack of a control group and the small sample size may hamper the statistical adequacy of our study, our findings seem to support the hypothesis that both ASCUS and L-SIL in postmenopausal women need a different and more specific diagnostic flow-chart. Nevertheless, longer follow-up periods and larger studies are needed to confirm this conclusion. However, in our study ASCUS/L-SIL ratio decreased from 3.3 to 1.8. In particular, ASCUS patients decreased from 195 to 23 after ERT.

In conclusion, a correct diagnosis and an adequate treatment seem to be obtained with a short-time ERT followed by a short-time cytological and colposcopic follow-up. With a single course of local ERT it may be possible to distinguish between benign CVS mimicking atrophy and true preneoplastic changes. Estrogen therapy will often cause enough ectropion of the endocervical cells so that the entire SCJ can be visualized. Moreover, it may reduce the number of endocervical curettage or loop excision or cone procedure for women with inadequate colposcopic examination [30].

## References

- [1] Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287:2114–9.
- [2] National Cancer Institute Workshop. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. *JAMA* 1989;262:931–4.
- [3] Kurman R, Henson D, Herbst A, Noller KL, Schiffman MH. Interim guidelines for management of abnormal cervical cytology. *JAMA* 1994;271:1866–9.
- [4] Kurman R, Solomon D. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: definitions, criteria and explanatory notes for terminology and specimen adequacy. New York: Springer Verlag; 1994.
- [5] Prendiville W, Ritter J, Tatti S, Twigg L. Management del Pap test anormale. Linee guida della SICPCV. In: *Colposcopy: management options*. Elsevier Italia; 2005. p. 205.
- [6] Prendiville W, Ritter J, Tatti S, Twigg L. Anatomia ed istopatologia delle neoplasie intraepiteliali del tratto genitale inferiore. In: *Colposcopy: management options*. Elsevier Italia; 2005. p. 12.
- [7] Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000;19:1–5.
- [8] Walboomers JMM, Jacobs MW, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12–9.
- [9] Cibas ES, Browne TJ, Bassichis MH, Lee KR. Enlarged squamous cell nuclei in cervical cytologic specimens from perimenopausal women (PM Cells): a cause of ASC overdiagnosis. *Am J Clin Pathol* 2005;124:58–61.
- [10] Fidda N, Miron J, Rodgers WH, Rader A. Impact of the new Bethesda System 2001 on specimen adequacy of conventional cervicovaginal smears. *Diagn Cytopathol* 2004;30:235–9.
- [11] Sellors JW, Karwalajtys TA, Kaczorowski JA, et al. Prevalence of infection with carcinogenic human papillomavirus among older women. *Can Med Assoc J* 2002;167:871–3.
- [12] Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:464–74.
- [13] ASCUS LSIL Triage Study Group. Predicting absolute risk of CIN3 during post-colposcopic follow-up: results from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:341–8.
- [14] Wright Jr TC, Cox JT, Massad LS, Twigg LB, Wilkinson EJ. ASCCP-Sponsored Consensus Conference. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2002;287:2120–9.
- [15] Flynn K, Rimm D. Diagnosis of ASCUS in women over age 50 is less likely to be associated with dysplasia. *Diagn Cytopathol* 2001;24:132–6.
- [16] Dresang LT. Colposcopy: an evidence-based update. *J Am Board Fam Pract* 2005;18:383–92.
- [17] National Cancer Institute Workshop. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: revised after second National Cancer Institute Workshop (April 29–30,1991). *Acta Cytol* 1993;37:115–24.
- [18] Abati A, Jaffurs W, Wilder AM. Squamous atypia in the atrophic cervical vaginal smear: a new look at an old problem. *Cancer* 1998;84:218–25.
- [19] Selvaggi SM. Atrophic vaginitis versus invasive squamous cell carcinoma on ThinPrep cytology: can the background be reliably distinguished? *Diagn Cytopathol* 2002;27:362–4.
- [20] Saad RS, Kanbour-Shakir A, Lu E, Modery J, Kanbour A. Cytomorphologic analysis and histological correlation of high-grade squamous intraepithelial lesions in postmenopausal women. *Diagn Cytopathol* 2006;34:467–71.
- [21] Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer statistics, 2004. *Cancer J Clin* 2004;54:8–29.
- [22] Menezes GA, Wakely PE, Stripe DM, Nuovo GJ. Increased incidence of atypical Papanicolaou tests from Thinpreps of postmenopausal women receiving hormone replacement therapy. *Cancer Cytopathol* 2001;93:357–63.
- [23] Smith JS, Green J, Berrington de Gonzalez A, et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 2003;361:1159–67.
- [24] Moodley M, Moodley J, Chetty R, Herrington CS. The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: a review. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13:103–10.
- [25] Johnston EI, Logani S. Cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance in perimenopausal and postmenopausal women: lessons learned from human Papillomavirus DNA testing. *Cancer* 2007;111:160–5.
- [26] Moss S, et al. Effect of testing for human papillomavirus as a triage during screening for cervical cancer: observational before and after study. *BMJ* 2006;332:83–5.
- [27] Saunders N, Anderson D, Gilbert L, Sharp F. Unsatisfactory colposcopy and the response to orally administered oestrogen: a randomized double blind placebo controlled trial. *Br J Obstet Gynaecol* 1990;97:731–3.
- [28] Milam MR, Pollock JW, Nick AM, Scott T, Jones 3rd HW. The effect of hormonal contraception on the adequacy of colposcopic examination of the cervix. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:1368–9.
- [29] Kim JJ, Wright TC, Goldie SJ. Cost-effectiveness of alternative triage strategies for atypical squamous cells of undetermined significance. *JAMA* 2002;287:2382–90.
- [30] Solomon D, Stoler M, Jeronimo J, Khan M, Castle P, Schiffman M. Diagnostic utility of endocervical curettage in women undergoing colposcopy for equivocal or low-grade cytologic abnormalities. *Obstet Gynecol* 2007;110:288–95.

## **I tumori squamosi della cervice uterina: percorsi clinici**

Sin dal 1945, anno in cui George Papanicolau ha ideato il Pap-test, la cervice uterina è stata oggetto di innumerevoli studi, protagonista di planetari programmi di screening e bersaglio di recentissime campagne vaccinali.

Nonostante ciò, il carcinoma della cervice uterina continua ad essere una delle principali cause di morte delle donne nel mondo, soprattutto nei paesi sottosviluppati. Rappresenta infatti, nella popolazione femminile, il secondo cancro per incidenza, dopo il carcinoma mammario (93).

Ogni anno vengono diagnosticati circa 500.000 nuovi casi. Nei paesi sviluppati le donne sono state “educate” ad aderire a programmi di screening mediante Pap-test, con una diminuzione della mortalità di circa il 70% (94). Nei paesi sviluppati, per le donne che non aderiscono ai programmi di screening, l’incidenza della neoplasia cervicale uterina è massima intorno ai 50 anni, ed è circa di 30 casi su 100.000 donne. Nei paesi in via di sviluppo l’incidenza è di 2-5 volte superiore, rappresentando la maggiore causa di mortalità femminile nell’Africa sub-sahariana, nell’Africa Centrale, nel Sudafrica e nell’India. In Europa l’incidenza più alta di cancro cervicale è osservata in Portogallo (19 su 100.000) e la più bassa in Lussemburgo (4 su 100.000). La mortalità più alta si riscontra in Danimarca, Austria e Portogallo (6-7 su 100.000) mentre la più bassa si registra in Lussemburgo e in Finlandia (1 su 100.000) (95).

In Italia, il carcinoma invasivo della cervice, ha un incidenza di circa 10 casi ogni 100.000 donne, ogni anno insorgono 3700 carcinomi e di questi circa 1600 decedono per malattia (96).

Per ciò che attiene ai fattori di rischio, da diversi studi emerge in modo preminente la relazione tra carcinoma della cervice ed attività sessuale (75). In particolare, il precoce inizio dell'attività sessuale, l'elevato numero di partner sessuali, l'età della prima gravidanza e le infezioni genitali a trasmissione sessuale, suggerendo l'esistenza di un carcinogeno trasmesso sessualmente nell'eziologia delle lesioni preneoplastiche e neoplastiche della cervice uterina che è stato identificato nell'HPV. L'infezione da Human Papilloma Virus (HPV), soprattutto dei sottotipi 16 e 18, è stata associata all'insorgenza di carcinoma della cervice. L'HPV, infatti, è stato identificato in circa il 90% dei carcinomi invasivi di tipo squamoso, con maggiore prevalenza, in ordine decrescente, dei genotipi di HPV 16, 18, 33, e 45 (24), e nel 50% dei casi di adenocarcinoma del canale cervicale (97,98), con maggiore prevalenza dei genotipi di HPV 18 e 16 (24). Altri agenti infettivi come l'Herpes Virus 2 (HSV 2), stati di immunodepressione congenita o acquisita (infezione da HIV, trattamenti immunosoppressivi) possono essere considerati possibili cofattori.

Dal punto di vista microscopico si distinguono vari istotipi di carcinoma cervicale (tab. 13): il carcinoma squamocellulare rappresenta l'80-85% dei casi, l'adenocarcinoma il 13-22% (la sua frequenza è raddoppiata negli ultimi decenni), mentre più raro è il carcinoma neuroendocrino. Altri rari istotipi sono i sarcomi ed i linfomi.

**Tabella 13:** Classificazione istologica della WHO del carcinoma invasivo della cervice uterina

<b>Carcinoma a cellule squamose</b>	<b>Altri tumori epiteliali</b>
Microinvasivo	Adenosquamoso
Invasivo	A cellule a vetro smerigliato
Verrucoso	Adenosquamoso a cellule chiare
Ulcerato (condilomatoso)	Mucoepidermoide
Squamopapillare (a cellule di transizione)	Adenoideo-cistico
A cellule simil linfepitelioma	Adenoideo-basale
	Carcinoide tipico
	Carcinoide atipico
	Neuroendocrino a grandi cellule
	A piccole cellule
	indifferenziato

Il *carcinoma squamoso*, origina prevalentemente a livello della giunzione squamo-colonnare da preesistenti displasie squamose. Se ne distinguono 3 sottotipi, a seconda delle cellule che lo compongono: a grandi cellule cheratinizzanti, ben differenziato; a grandi cellule non cheratinizzanti, moderatamente differenziato; a piccole cellule non cheratinizzanti, molto rari, scarsamente differenziato.

Altro tumore epiteliale, da ricordare, per l'elevata capacità metastatica, è il *carcinoma a piccole cellule*. Esso è correlato, infatti, ad una prognosi molto severa, con precoce disseminazione metastatica, sia per via linfatica che per via ematogena.

Dal punto di vista macroscopico, invece, il carcinoma invasivo della cervice si rende evidente con tre tipi di crescita: vegetante (o esofitico), ulcerato e infiltrativo. La variante più comune è quella vegetante, che si manifesta come una massa che protrude dalla superficie mucosa e la cui natura neoplastica è di facile individuazione (60).

Il carcinoma della cervice uterina tende a crescere localmente, diffondendosi per continuità al canale cervicale, al corpo uterino e alla vagina, per contiguità ai tessuti paracervicali (parametri) e agli organi pelvici limitrofi (retto e vescica) per poi diffondersi alle strutture linfonodali locoregionali per via linfatica retroperitoneale e



dare tardivamente metastasi a distanza per diffusione ematica. L'interessamento della vagina e dei parametri può anche avvenire per via linfatica. Questa evolutività è rispecchiata nel sistema di stadiazione della FIGO (fig. 16): Stadio I, il tumore è confinato alla cervice uterina; stadio II, è esteso alla vagina o al parametrio ma non alla parete pelvica; stadio III, è esteso alla parete pelvica con eventuale idronefrosi o rene non funzionante; stadio IV, c'è invasione tumorale della vescica o della mucosa del retto o metastasi a distanza.

Nei casi invasivi di cervicocarcinoma, la lesione è visibile ad occhio nudo. Tuttavia esistono forme di carcinoma invasivo pre-clinico in cui l'aspetto della cervice è del tutto normale. Pertanto, la citologia eso-endocervicale e la colposcopia con biopsia sono esami diagnostici essenziali.

La colposcopia è indispensabile per valutare la topografia e l'estensione della lesione sulla cervice, ed eventualmente sui fornici vaginali, e per mirare l'esecuzione dei prelievi bioptici.

Il carcinoma preclinico è sospettabile con la colposcopia per la presenza di epitelio bianco ispessito, puntato e/o mosaico irregolare, sbocchi ghiandolari ispessiti e vasi atipici.

La diagnosi di carcinoma cervicale invasivo deve essere eseguita sulla base di un esame bioptico mirato, in caso di neoplasia clinicamente evidente, o di una conizzazione, in caso di una lesione preclinica, con esame istologico seriato del cono.

Le modalità di stadiazione differiscono sostanzialmente tra lo stadio IA e gli altri. Nel primo, la definizione dello stadio (IA1 versus IA2) si basa esclusivamente sull'esame istologico della conizzazione, mentre negli altri stadi la definizione dell'estensione della malattia si fonda essenzialmente sull'esame clinico.

La visita ginecologica con esplorazione rettale deve essere eseguita sempre dal ginecologo oncologo capo equipe; requisito essenziale è la misurazione clinica del collo/tumore in due dimensioni: anteroposteriore e laterolaterale. La visita in anestesia può essere utile soprattutto quando la neoplasia sembra superare i limiti della cervice uterina. È indicata inoltre, l'esecuzione dell'Rx torace. Esami ancillari sono rappresentati dalla TC e dalla RM, i cui reperti non dovrebbero modificare la stadiazione clinica. Data la maggiore sensibilità e specificità della RM a livello del tumore primitivo, questa metodica, dove disponibile, è da preferirsi alla TC.

L'urografia, pur essendo prevista di routine dalla di FIGO, può essere riservata ai casi con evidenza all'ecografia o alla TC di dilatazione delle vie urinarie. Analogamente, la cistoscopia e la rettoscopia dovrebbero essere riservate a pazienti con neoplasie clinicamente voluminose o nelle quali le altre indagini clinico-radiologiche hanno evidenziato un sospetto di interessamento di vescica o retto.

Per quanto riguarda la valutazione dei parametri, vanno classificati in stadio IIB i casi in cui il parametrio sia indurito, retratto o fisso, senza interessamento della parete pelvica, mentre vanno considerati in stadio IIIB i casi in cui si riscontrino nodularità parametriali, e quindi continuità neoplastica, fino alla parete pelvica. La presenza di una idroureteronefrosi o di un rene escluso conseguente ad interessamento dell'uretere, da parte del tumore, fa classificare la neoplasia in stadio IIIB.

Il sospetto interessamento della mucosa vescicale o rettale alle indagini endoscopiche deve essere confermato con esame istologico su biopsia.

Lo stadio deve essere definito clinicamente prima di qualunque terapia. Quando vi sia un dubbio, bisogna classificare la neoplasia allo stadio inferiore.

L'obiettivo primario della diagnosi clinico-strumentale è quello di differenziare le neoplasie inizialmente invasive, suscettibili di trattamento primario chirurgico o radiante esclusivo (IA1 e IA2, IB1 e IIA < 4cm); dalle forme localmente avanzate in cui è indicata una chemio-radioterapia concomitante esclusiva o una chemioterapia neoadiuvante seguita da isterectomia radicale (IB2 e IIA > 4cm, da IIB a IVB).

Il carcinoma squamoso della cervice uterina è una delle neoplasie con il migliore indice di cura, con un tasso di cura globale pari al 50%.

Come per la maggior parte dei tumori solidi, il volume tumorale e lo stato linfonodale, associati allo stadio clinico rappresentano i fattori prognostici principali; l'istotipo e il grado di differenziazione cito-istologica sono il secondo più importante fattore di prognosi; il grado di neoangiogenesi, la diffusione neoplastica negli spazi capillarosimili, lo stato dei margini di resezione, oltre all'età della paziente ed alla comorbidità rappresentano ulteriori importanti fattori prognostici.

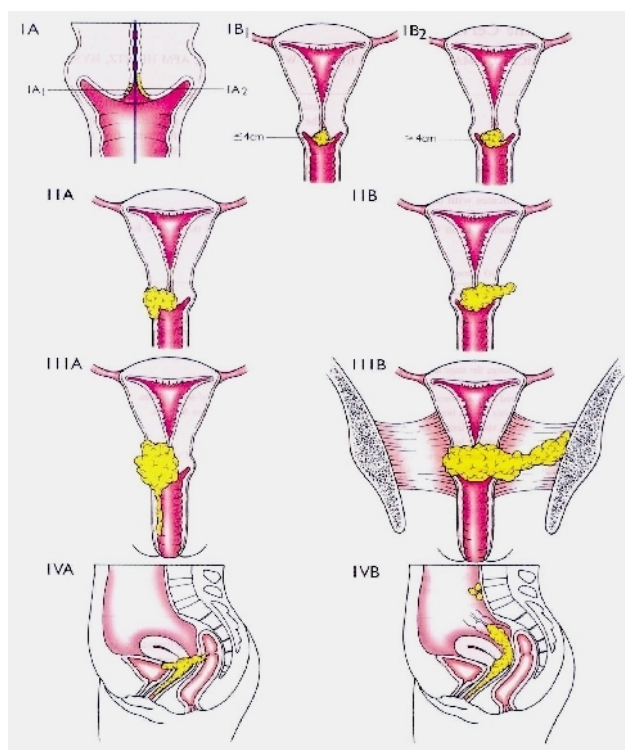
La prognosi più sfavorevole nelle donne giovani. Essa varia in rapporto alla diffusione al tessuto parametrico: la sopravvivenza complessiva a 5 anni raggiunge circa il 100% per i tumori allo stadio IA ed il 70-85% per quelli allo stadio IB1 e per le lesioni più piccole dello stadio IIA. La sopravvivenza complessiva libera da malattia è circa 50-70% nello stadio IB e IIB, del 30-50% nello stadio III e del 5-15% nello stadio IV. In rapporto allo stato linfonodale, la sopravvivenza a 5 anni secondo alcuni autori risulta correlata al numero di linfonodi interessati: 62% per un linfonodo positivo; 36% per due linfonodi positivi; 20% per tre o quattro linfonodi positivi e, 0% per 5 o più linfonodi, secondo altri autori è in relazione alla sede dei linfonodi positivi: 35-78% in presenza di metastasi linfonodali pelviche, del 5-40% per metastasi linfonodali paraortiche e dello 0-18% per interessamento linfonodale

pelvico e lombo-aortico. La positività dei linfonodi lombo-aortici, infatti, è generalmente espressione di diffusione sistemica della malattia, ed il 5-30% di queste pazienti hanno anche metastasi occulte nei linfonodi sovraclaveari. A parità di stadio clinico, le pazienti operate con linfonodi positivi hanno una sopravvivenza a 5 anni che è circa la metà di quella delle pazienti con linfonodi negativi.

Considerando che il 75% delle recidive si verificano entro 2 anni dal trattamento, le visite di follow-up dovrebbero essere più frequenti in questo periodo.

In accordo con le principali linee guida, presso i nostri ambulatori specialistici di follow-up oncologico, nei primi due anni eseguiamo ogni 3-4 mesi un esame obiettivo della paziente con valutazione di dolore, sanguinamenti vaginali, calo ponderale, funzione intestinale e vescicole, linfadenopatie inguinali e sovraclaveari. Gli strumenti sono rappresentati da visita ginecologica rettovaginale per valutare sofficità vaginale, parametricale, eventuali masse pelviche; pap-test; markers tumorali; esami radiologici ed ecografici. Dai 3 ai 5 anni l'intervallo di sorveglianza può essere portato a 6 mesi con valutazione annuale di una radiografia del torace e una TC addome-pelvi.





**figura 16:** stadiazione FIGO del carcinoma della cervice uterina.

## **Tumori squamosi rari: carcinoma neuroendocrino, nostra esperienza**

Il carcinoma neuroendocrino a piccole cellule della cervice uterina (SCNCC) è un raro tumore (2-3% di tutte le neoplasie cervicali) (99,100). Reagan et al (101) per primi hanno descritto il carcinoma neuroendocrino indifferenziato a piccole cellule della cervice uterina nel 1957, definendolo come un'entità diversa da come era stato fino ad allora definito, e cioè un raro sottotipo di carcinoma a cellule squamose. SCNCC presenta caratteristiche cliniche e biologiche intermedie tra il cervicocarcinoma e i tumori neuroendocrini a piccole cellule (102), infatti possiede un'aggressività locale con eziopatogenesi associata al papillomavirus simile al cervicocarcinoma e aspetti tipici dei tumori neuroendocrini a piccole cellule di qualsiasi altro sito, la disseminazione precoce della malattia e la perdita di eterozigosi.

Istologicamente, SCNCC è simile al carcinoma a piccole cellule del polmone ed è classificato come carcinoma della cervice a piccole cellule nella World Health Organization International Histologic Classification of Tumors (103). E' riconosciuto essere molto aggressivo e presenta la prognosi peggiore tra tutti i carcinomi cervicali (104). Sebbene la sua storia naturale sia oggi ben conosciuta, la sua estrema rarità rappresenta un limite per la possibilità di stabilire un management ed una terapia efficace.

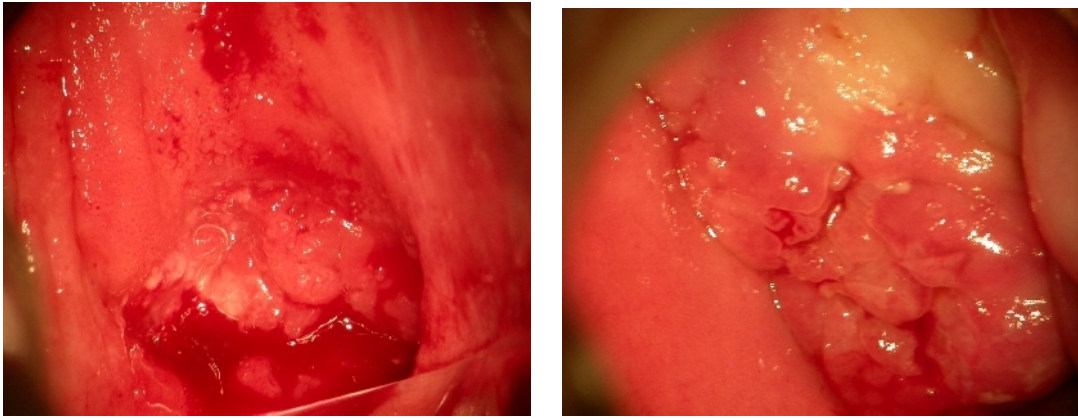
Di seguito viene descritto un caso di una donna di razza caucasica di 48 anni con un SCNCC polipoide inizialmente diagnosticato come carcinoma squamoso infiltrante della cervice e le strategie di management che sono state adottate.

### *Case report*

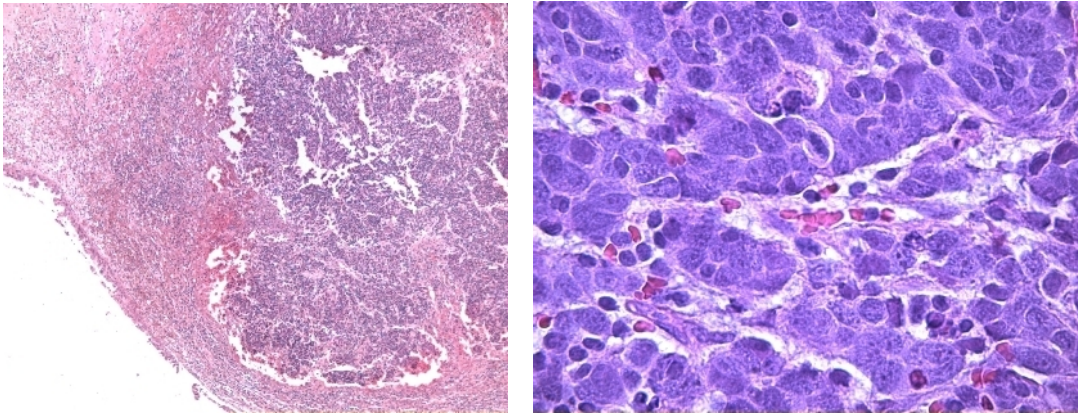
Storia clinica: donna di razza caucasica di 48 anni, 3 para, riferiva sanguinamento postmenopausale da 2 mesi. L'esame ginecologico e l'ecografia transvaginale mostravano una massa endocervicale. La colposcopia e l'isteroscopia confermavano la massa polipoide sul versante endocervicale del labbro posteriore della cervice (fig. 17). All'esame istologico della biopsia, la massa tumorale era definita essere un carcinoma squamoso infiltrante della cervice. Gli esami di laboratorio e i markers tumorali (CA 125, CA 19-9, CA 15-3, TPS e CEA) erano nella norma.

La RM addome e pelvi rivelava ingrandimento linfonodale pari a 1x1,5 cm e 2,5x1,5 cm in sede destra e sinistra rispettivamente. La paziente veniva sottoposta ad isterectomia radicale con salpingo-ovariectomia bilaterale e linfadenectomia pelvica e paraortica. L'esame istologico del pezzo operatorio rivelava un 'area necrotica endocervicale infiltrante per 2 mm e 5 linfonodi metastatizzati.

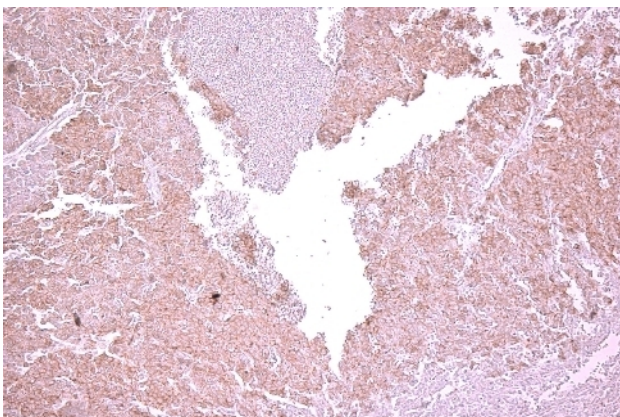
La massa tumorale, all'esame istologico, era composta da masse, corde e trabecole di piccole cellule, con nuclei ipercromatici anomali e alto indice mitotico ( $> 2$  mitosi per HPF). Il citoplasma era invece scarso (fig. 18,19). Non venivano identificate aree di carcinoma squamoso o di adenocarcinoma. Il profilo immunocitochimico presentava positività per l'enolasi neurone-specifica e la sinaptofisina (fig. 20). Veniva evidenziato, inoltre, un epitelio colonnare cervicale intatto. La diagnosi finale era di carcinoma cervicale neuroendocrino a piccole cellule (FIGO stadio IIIB). La paziente veniva sottoposta a radio-chemioterapia adiuvante. Ad un anno di follow-up la paziente era libera da malattia.



**Figura 17:** Carcinoma neuroendocrino della cervice uterina.



**Figura 18 e 19:** esame istologico della massa tumorale con particolare cellulare



**Figura 20:** esame immunocitochimico, positività per la sinaptofisina



### *Discussione*

Il carcinoma neuroendocrino a piccole cellule della cervice uterina è altamente maligno ed è associato con il più basso tasso di sopravvivenza tra tutti i cancri della cervice.

Istologicamente, ricorda il carcinoma a piccole cellule del polmone e viene classificato come carcinoma a piccole cellule della cervice nella World Health Organization International Histologic Classification of Tumors. Il tasso di sopravvivenza a più di 5 anni per le pazienti con SCNCC della cervice varia tra il 17% e il 67% per tutti gli stadi.

In un recente studio, il tasso di sopravvivenza a 5 anni delle pazienti con stadio IB1 (FIGO) era compreso tra il 50% e il 60%, significativamente peggiore del tasso del 90% in pazienti in stadio IB1 con carcinoma a cellule squamose (104).

Considerando la prognosi peggiore del SCNCC, più informazioni devono essere raccolte circa i fattori prognostici.

I fattori prognostici negativi sono il fumo di sigaretta, il pattern polipoide (105), la presenza di positività linfonodale, l'istologia, il trattamento chirurgico, lo stato dei margini e uno stadio FIGO avanzato.

Anche fattori prognostici immunoistochimici sono stati valutati. Straughn et al (106) hanno studiato la relazione tra i markers molecolari e la sopravvivenza. Quattordici (88%) dei 16 carcinomi a piccole cellule erano positivi per l'enolasi neurone specifica, la cromogranina o la sinaptofisina. Pazienti che erano positive per la cromogranina presentavano una sopravvivenza significativamente più bassa rispetto a quelle cromogranina negative. Gli autori, inoltre, hanno riscontrato una ridotta sopravvivenza per le pazienti che non esprimevano p53. Essi non hanno

trovato correlazione tra la sopravvivenza e l'espressione di erb2, antigene di proliferazione nucleare cellulare o c-myc. Se il SCNCC ricorda il cancro a piccole cellule del polmone, alla valutazione immunoistochimica del SCNCC, la sovra espressione della proteina c-kit è un evento infrequente rispetto al cancro a piccole cellule del polmone. Questo report evidenzia la differenza in termini eziopatogenetici, esistente tra questi 2 tipi di tumori a piccole cellule (107).

Tangjitgamol et al. (108) hanno studiato come fattori prognostici immunoistochimici le anomalie di espressione dei recettori di fattori di crescita o enzimi coinvolti nei processi neoplastici e il loro possibile ruolo come indicatori prognostici e come bersaglio di nuovi agenti chemioterapici. In questo studio, l'espressione di VEGF presentava un'alta prevalenza, HER-2/neu era significativamente associata ad una maggiore sopravvivenza. Pazienti con HER-2/neu negativo presentavano una sopravvivenza significativamente più corta rispetto alle positive, 14.2 mesi (95% CI, 10.6217.7 mesi) contro 33.1 mesi (95% CI, 0276.92 mesi) ( $p=0.03$ ). Inoltre, vi era una minore sopravvivenza in pazienti con espressione di EGFR, ma questo dato non era significativo. Infine, la combinazione della negatività di HER-2/neu e la positività di EGFR aveva un impatto peggiore sulla sopravvivenza. Sulla base di questi dati, l'autore ha proposto la possibilità di effettuare trials clinici per valutare nuovi agenti chemioterapici aventi come bersaglio d'azione queste proteine. Questo tipo di chemioterapici venivano utilizzati da soli o in combinazione con altri chemioterapici già ritenuti efficaci o in combinazione con la radioterapia. Data l'elevata prevalenza di espressione di VEGF, è stata sperimentata l'introduzione di inibitori del recettore di VEGF nel trattamento del carcinoma cervicale neuroendocrino. Sebbene sia stato dimostrato un

miglioramento della prognosi nelle pazienti HER-2/neu positive maggiore rispetto a quelle negative, la maggior parte delle pazienti in entrambi i gruppi ha presentato prognosi infausta. Tangjitgamol ha ipotizzato che l'interferone potesse aumentare l'espressione di HER-2/neu e, pertanto, potesse migliorare la prognosi delle pazienti che non esprimevano questo marker. Nelle pazienti con espressione di HER-2/neu, il trattamento con trastuzumab (Herceptin) può essere combinato con altri farmaci chemioterapici per massimizzare i potenziali effetti terapeutici.

Data la rarità del SCNCC, non vi sono studi multicentrici e l'approccio terapeutico iniziale ottimale non è stato chiarito. Sebbene la radicalità chirurgica non sia associata ad un aumento della sopravvivenza (109), molti ginecologi oncologi praticano la chirurgia radicale che è la procedura chirurgica standard per gli stadi IB e II del carcinoma della cervice di qualsiasi tipo istologico. Al contrario, la prognosi per le pazienti con carcinoma a cellule squamose della cervice uterina che vengono trattate con isterectomia radicale è migliore. Le recidive si sviluppano nel 10%-15% delle pazienti con stadio IB o IIA sottoposte ad isterectomia radicale, con o senza radioterapia postoperatoria dell'intera pelvi (110). In seguito ad isterectomia radicale, la differenza in termini di sopravvivenza tra le pazienti con carcinoma a cellule squamose e quelle con SCNCC si basa sulle diverse caratteristiche biologiche dei 2 carcinomi.

Nelle pazienti con SCNCC, la sola prevenzione di recidive a livello pelvico di solito non permette un buon follow-up a causa dell'alta incidenza delle metastasi a distanza anche negli stadi precoci. Lo sviluppo di metastasi ematogene diffuse è la caratteristica principale del SCNCC e il controllo dello sviluppo di queste

rappresenta la principale priorità per migliorare la sopravvivenza delle pazienti con questo tipo di carcinoma della cervice.

Inoltre, la morbidità associata alla isterectomia radicale (linfedema, disfunzione cronica della vescica (nel 3% delle pazienti), la fistola ureterovaginale o vescicovaginale, la formazione di linfocele (5%), occlusione dell'intestino tenue (1%), embolia polmonare (1-2%), danno dei nervi otturatorio o genitofemorale e perdite di sangue che richiedono trasfusioni deve essere tenuta in considerazione nella terapia adiuvante sistemica postoperatoria per il controllo delle metastasi a distanza.

Recenti studi hanno posto la loro attenzione sulla prevenzione delle recidive pelviche dopo isterectomia radicale. Essi non hanno evidenziato nessun beneficio per le pazienti con SCNCC sottoposte ad isterectomia radicale. La stessa isterectomia radicale dovrebbe pertanto essere limitata a quelle pazienti con una lesione invasiva precoce senza metastasi linfonodali evidenti. Al contrario, dovrebbe essere effettuata un'isterectomia non radicale seguita da una chemioterapia adiuvante aggressiva.

L'isterectomia radicale, pertanto, non risulta essere utile nelle pazienti con SCNCC, e le indicazioni per questo trattamento sono limitate.

Nel nostro caso è stata effettuata una chirurgia radicale a causa dell'iniziale diagnosi istologica di carcinoma squamoso della cervice alla biopsia cervicale.

Differenti schemi di chemioterapia e chemio-radioterapia sono prese in considerazione per il trattamento del SCNCC.

La strategia terapeutica ottimale per le pazienti con una malattia in stadio precoce non è stata ancora ben definita.



La chemioterapia neoadiuvante è raccomandata per le pazienti con tumore superiore a 4 cm (106,111) ma sebbene essa sembri essere utile per migliorare la resecabilità dei tumori più voluminosi, non determina un aumento della sopravvivenza.

Inoltre, la chemio radioterapia potrebbe essere usata per il trattamento delle pazienti con una malattia in stadio avanzato, nonostante la loro pessima prognosi combinando fin dall'inizio la chemioterapia e la radioterapia. Ciò sembra correlato ad un leggero miglioramento della prognosi (112).

Nonostante risultati favorevoli sono stati riportati per le pazienti con SCNCC che ricevevano chemio-radioterapia seguita da cicli addizionali di chemioterapia (111), altri studi hanno evidenziato che la chirurgia radicale è un importante componente nel trattamento multimodale del SCNC (113).

Sebbene esistano pochi dati clinici a supporto dell'uso di trattamenti multimodali adiuvanti negli stadi precoci del SCNCC, molti clinici preferiscono usare la chemioterapia e/o la radioterapia sulla base di forti evidenze relative all'efficacia della chemio-radioterapia negli altri tipi di cancro della cervice e sulla base dell'alta incidenza di metastasi a distanza nelle pazienti con SCNCC (114). Le pazienti che hanno ricevuto un trattamento radioterapico adiuvante, inoltre, presentano una prognosi peggiore rispetto a quelle che non l'hanno ricevuto; da ciò si deduce che escludendo le pazienti con piccoli tumori (2 cm), la radioterapia adiuvante non deve essere fatta. Questa evidenza è supportata da altri studi che sostengono l'incapacità della radioterapia adiuvante di ridurre il tasso di recidive pelviche (114). Al contrario, la chemioterapia è indicata in quanto la chemioterapia adiuvante, sebbene

sia associata ad una certa tossicità, induce un maggiore sopravvivenza per le pazienti inizialmente trattate con chirurgia per SCNCC.

Inoltre, in uno studio retrospettivo molto recente su 68 pazienti (107), la chemioterapia adiuvante determinava un miglioramento della prognosi, ma la differenza non era statisticamente significativa. Quando la chemioterapia adiuvante e la chemio radioterapia sono state confrontate, quest'ultima non presentava differenze significative in termini di sopravvivenza. Sebbene la radioterapia adiuvante inducesse una riduzione delle recidive pelviche, non era correlata ad un miglioramento della sopravvivenza a causa dell'incapacità nel prevenire le metastasi a distanza. In aggiunta, la radioterapia adiuvante più la concomitante chemioterapia determinavano un notevole aumento della tossicità, con conseguente necessità di interrompere il trattamento. Inoltre, non si evidenziavano significativi benefici in termini di sopravvivenza nelle pazienti che ricevevano la chemioterapia adiuvante. A causa dell'alta incidenza delle precoci metastasi linfonodali e a distanza negli stadi precoci del SCNCC, la chemioterapia adiuvante potrebbe aumentare la sopravvivenza rispetto alla radioterapia (107).

Nonostante la presenza in letteratura di studi retrospettivi e di case reports, la migliore modalità di trattamento rimane controversa.

Pertanto, considerando la rarità di questa infausta malattia, sarebbero necessari trials clinici multicentrici per stabilire un trattamento univoco ed efficace per il SCNCC e per indurre un significativo aumento della sopravvivenza.



SUPPLEMENTO AL  
Volume XXX n. 6/7- 2008

**G**IORNALE ITALIANO  
DI OSTETRICIA  
E GINECOLOGIA

ORGANO UFFICIALE ISGE ITALIA, FIOG, AGUI

**Atti del**



**16° CONGRESSO  
NAZIONALE  
della  
FEDERAZIONE  
ITALIANA  
di OSTETRICIA  
e GINECOLOGIA**

16° CONGRESSO NAZIONALE AGUI  
14° CONGRESSO NAZIONALE A.GI.CO.  
10° CONGRESSO NAZIONALE AGEO

Roma, 5-7 novembre 2008

*La donna  
tra scienza e società*



**CIC** Edizioni Internazionali



para è giunta alla nostra osservazione nell'ottobre 2005 per algie pelviche alla 9ª settimana di amenorrea, con anamnesi positiva per teratoma maturo ovarico sinistro asportato laparoscopicamente 4 anni prima. L'esame ecografico transvaginale ha posto diagnosi di cisti ovarica destra di 9 cm di diametro medio, a contenuto fluido, con parete irregolare per la presenza al suo interno di una papilla debolmente vascolarizzata al Power Doppler (color score: 2). Il CA 125 sierico è risultato lievemente aumentato (55 U/mL). La paziente è stata, quindi, sottoposta a laparoscopia operativa con asportazione di cisti ovarica destra. L'annesso di sinistra è apparso regolare. L'esame istologico ha posto diagnosi di "teratoma ovarico immaturo di grado I".

**Risultati:** La gravidanza ha avuto un decorso regolare e il parto è stato espletato mediante taglio cesareo urgente per distocia. Durante l'intervento sono state ispezionate le ovaie, risultate macroscopicamente nella norma. A 5 mesi dal taglio cesareo la paziente è stata sottoposta a *second-look* laparoscopico. Entrambe le ovaie sono apparse di volume e superficie regolari, con segni funzionali. Sono stati eseguiti, inoltre, washing peritoneale, biopsie ovariche bilaterali e peritoneali, risultati negativi. Il follow-up clinico, laboratoristico ed ultrasonografico è risultato negativo.

**Conclusioni:** La laparoscopia permette di intervenire in assoluta sicurezza anche durante il primo trimestre di gravidanza. Una diagnosi ecografica accurata ha permesso di individuare una formazione ovarica con un concreto rischio di malignità. Il trattamento conservativo in una donna giovane che non ha ancora concluso il suo ciclo riproduttivo sembra essere accettabile.

#### P 181

##### UN CASO DI ENDOMETRIOSI SEVERA CON COINVOLGIMENTO DELL'URETERE TRATTATO CON ANASTOMOSI URETERO-URETERALE

Leanza V., Sampugnaro E.G., Cavallaro A.A., Minutolo E.S., Mille V., Panella M.M.

Dipartimento DOGIRA, Clinica Ostetrica e Ginecologica, Ospedale Vittorio Emanuele - Catania

**Obiettivi dello studio:** L'endometriosi è una malattia a carattere cronico recidivante dovuta alla presenza di tessuto endometriale ectopico, ha e, in base al numero e alla localizzazione degli impianti, si distingue in minima, lieve, moderata e severa. L'ovaio rappresenta l'organo più frequentemente coinvolto mentre l'interessamento ureterale con stenosi severa e idronefrosi è estremamente raro.

Il caso esaminato riguarda una paziente di anni 47 ricoverata presso la clinica ostetrica dell'Ospedale Vittorio Emanuele di Catania.

**Materiali:** La paziente riferiva menometrorragie, algie in

fossa iliaca destra e dismenorrea da circa un anno. Alla visita ginecologica l'utero era di consistenza aumentata, a superficie irregolare e di volume triplo rispetto alla norma, annessi erano e lievemente dolenti. All'ecografia endovaginale l'utero appariva antiversoflesso di volume aumentato (diametro longitudinale 122 mm, anteroposteriore 70 mm, latero-laterale 72 mm) ad ecostruttura disomogenea per la presenza di miomi multipli (il primo del fondo, intramurale e del diametro massimo mm 64, il secondo istmico del diametro massimo di 29 mm). A carico dell'annesso destro formazione cistica complex di 68 per 49 mm; annesso sinistro di volume e morfologia regolari. A carico del rene destro si evidenziava idroureteronefrosi fin alla regione pelvica, sede di endometriosi; rene sinistro regolare.

**Risultati:** La paziente è stata sottoposta a laparotomia trasversale sovrappubica; aperto il peritoneo si evidenziava l'ovaio di destra aumentato di volume per la presenza di cisti endometriosica a sviluppo retroperitoneale che inglobava ed infiltrava la porzione retroligamentosa dell'uretere pelvico destro. Si procedeva quindi ad isterectomia totale con annessectomia destra e salpingectomia sinistra, resezione di manicotto endometriosico periureterale destro con asportazione del tratto stenotico dell'uretere, anastomosi uretero-ureterale termino-terminale previo spatolamento delle estremità prossimale e distale del tratto interessato ed incannulamento dello stesso mediante stent ureterale doppio "J". Alla cistoscopia transuretrale la mucosa vescicale appariva integra e di aspetto normale; dal meato ureterale destro si evidenziava l'estremità distale dello stent; uretere sinistro integro e pervio. Infine l'intervento è stato completato con elettrocoagulazione di focolai endometriosici residui. L'ovaio sinistro risultava inglobato e indissociabile dalla parete del sigma.

**Conclusioni:** I controlli ecografici e urografici successivi hanno evidenziato normopervietà ureterale e assenza di sintomatologia da endometriosi.

#### P 182

##### TUMORE NEUROENDOCRINO A PICCOLE CELLULE DELLA CERVICE UTERINA: CASE REPORT

Bifulco G., Giampaolino P., Mandato V.D., Lavitola G., De Rosa N., Piccoli R., Nappi C.

Dipartimento di Scienze Ostetrico, Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione Umana, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

**Obiettivi dello studio:** Il tumore neuroendocrino della cervice uterina è una neoplasia rara che rappresenta meno del 5% di tutte le neoplasie cervicali. Il carcinoma neuroendocrino a piccole cellule (CNPC), uno dei quattro sottotipi descritti, è caratterizzato da un'elevata aggressività, da una precoce capacità di dissemina-



zione a distanza e da una prognosi peggiore rispetto agli altri carcinomi cervicali.

**Materiali:** Donna quarantottenne, ricoverata per menorragia, ha presentato all'esame colposcopico una lesione esofitica della portio di consistenza duro fibrosa ipervascularizzata e risalente nel canale cervicale. La visita in narcosi confermò la presenza di una lesione < 1 cm senza infiltrazione parametriale e vaginale e la biopsia mirata rivelò un carcinoma squamoso non cheratinizzante. La RM confermò la diagnosi clinica e non rivelò linfadenopatia. La paziente quindi fu sottoposta ad isterectomia radicale tipo III sec. Piver con annessiectomia bilaterale, linfadenectomia pelvica e paraortica. L'esame istologico definitivo rivelò la presenza di un tumore neuroendocrino a piccole cellule di dimensioni < 1 cm e di 2 linfonodi pelvici positivi per neoplasia. La paziente pertanto fu sottoposta a radiochemioterapia adiuvante. Dopo 1 anno ha presentato una metastasi linfonodale laterocervicale.

**Risultati:** Il tumore neuroendocrino deriva dalle cellule del Kulchitsky con patogenesi ancora controversa. Un'elevata positività di HPV 18 associata alle mutazioni del gene p53 si ipotizza siano alla base della caratteristica aggressività di questa neoplasia. Anche l'associazione con il fumo pare caratterizzi i CNPC di particolare aggressività. Comunque anche se il 62% delle pazienti sono diagnosticate allo stadio IA, l'82% presenta malattia ricorrente o progressione ed inoltre l'associazione con metastasi linfonodali è presente nel 90% dei casi. La sopravvivenza osservata a 5 anni per le pazienti agli stadi IB1 e IB2-IIA varia tra il 30% ed il 60%. Il management del tumore neuroendocrino a piccole cellule rimane ancora controverso in quanto, a causa della loro rarità, è difficile eseguire dei trial clinici randomizzati controllati. L'approccio più diffuso per gli stadi iniziali, rimane ancora la terapia chirurgica seguita dalla chemioterapia adiuvante.

**Conclusioni:** La paziente nonostante presentasse un'lesione inferiore al centimetro, ha mostrato metastasi ai linfonodi latero-cervicali ad 1 anno dall'intervento e dopo la radio chemioterapia adiuvante. Confermando il comportamento particolarmente insidioso del CNPC.

#### P 183

##### UN TUMORE UTERINO SIMILE AI TUMORI DEI CORDONI SESSUALI GONADICI (UTROSCTS) TRATTATO CON CHIRURGIA RESETTOSCOPICA, LA DESCRIZIONE DI UN CASO

Garuti G., Mirra M., Gonfiantini C., Luerti M.

UO Anatomia Patologica - Lodi

**Obiettivi dello studio:** I tumori uterini simili ai tumori dei cordoni sessuali gonadici (*Uterine Tumours Resembling Ovarian Sex Cord Tumours*, UTROSCTS) so-

no rare neoplasie ad incerto potenziale di malignità, incidenti sia in menopausa che in età fertile. In letteratura sono descritti 48 casi per lo più diagnosticati dopo isterectomie totali eseguite per miomatosi uterina. Non sono descritti decessi per progressione di malattia ma vengono riportate sia estensioni loco-regionali pelviche che recidive addominali tardive. In letteratura sono descritti a tutt'oggi solo due casi di pazienti trattate conservativamente. Entrambe hanno concepito e si presentano libere da malattia dopo un follow-up medio di 16 mesi. Riportiamo di un terzo caso trattato conservativamente, in cui la diagnosi di UTROSCTS è stata posta dopo chirurgia resettoscopica.

**Materiali:** Con diagnosi di mioma uterino sottomucoso, G1, del diametro di 5 cm, una paziente di 29 anni era sottoposta a miomectomia resettoscopica bipolare nell'ottobre 2007. L'intervento veniva completato in un secondo step, con la completa resezione della componente intramurale del tumore, nel novembre 2007.

**Risultati:** L'esame istologico dimostrava un tumore completamente costituito da elementi epitelioidi arrangiati in nidi, cordoni, trabecole, tubuli e rosette, infiltranti il tessuto miometriale. Non risultava evidente alcuna differenziazione sarcomatosa stromale. L'immunostochimica evidenziava positività per inibina, calretinina, CD99, citocheratina e recettore per gli estrogeni. Su tale immunofenotipo veniva posta diagnosi di UTROSCTS. Lo staging strumentale della malattia non evidenziava estensioni a distanza. La rivalutazione isteroscopica e biotica a due mesi dal trattamento non evidenziava malattia residua. Ad un follow-up di 12 mesi la paziente è libera da malattia.

**Conclusioni:** In relazione al potenziale maligno incerto ed agli scarsi dati della letteratura, un trattamento conservativo degli UTROSCTS diagnosticati in età fertile appare sufficientemente prudente. Un rigoroso follow-up è necessario ed è raccomandabile il rapido completamento del desiderio riproduttivo.

#### P 184

##### ADENOCARCINOMA ENDOMETRIOIDE DELLA VAGINA: CASE REPORT

Ricciardi E., Ebano V., Valente A., Quarto A., Moscarini M.

Ospedale Sant'Andrea, Università degli Studi di Roma Sapienza

**Obiettivi dello studio:** L'adenocarcinoma endometrioide della vagina è un raro sottotipo degli adenocarcinomi della vagina. Sebbene più spesso ripetizione secondaria, in letteratura vengono descritti rari casi di localizzazione primitiva. Endometriosi e una pregressa cicatrice chirurgica (cupola vaginale post-isterectomia, episiotomia) a livello del sito di insorgenza appaiono essere presenti nella storia di questi casi.



## **CAPITOLO 2: Patologia pre-neoplastica e neoplastica dell'endocervice**

### **Le lesioni ghiandolari**

Le lesioni ghiandolari, sia di origine dall'epitelio cilindrico cervicale come pure da quello endometriale, possono essere un reperto rilevato dal pap test in donne asintomatiche, un reperto inaspettato in biopsie e soprattutto in pezzi istologici di conizzazioni eseguite per lesioni cervicali squamose intraepiteliali o microinvasive o più raramente in pezzi istologici di isterectomia eseguita per patologia benigna, oppure riscontrate dalla citologia o dall'istologia nel percorso diagnostico in donne con sanguinamenti anomali.

Un marcatore citologico potenzialmente indicativo di lesioni ghiandolari dell'endocervice è costituito dalle cellule AGC. La frequenza del riscontro di Cellule Ghiandolari Atipiche (AGC) nei pap test di screening, in donne senza precedenti anamnestici per patologia cervicale ghiandolare o squamosa (trattata o meno) si aggira, nelle varie casistiche, tra lo 0,1 e poco più dell'1% (115-117). In tale categoria rientrano tutte le cellule ghiandolari che non sono francamente benigne o reattive tipiche, ma neppure presentano quelle alterazioni cellulari sufficienti per porre diagnosi di neoplasia.

Data la sede del prelievo queste cellule ghiandolari atipiche possono originare sia, in caso di ectopia, dall'epitelio cilindrico dell'esocervice, sia dall'epitelio cilindrico proprio dell'endocervice, come pure dall'epitelio endometriale. Le AGC riscontrate al pap-test sono di origine endocervicale in circa il 63% dei casi, nel 5%

sono di origine endometriale e nel 32% si accompagnano anche a cellule squamose di significato non determinato (ASCUS) (116).

Le ACG possono essere espressione di alterazioni reattive, di displasie ghiandolari, di adenocarcinomi in situ o invasivi di origine endocervicale o endometriale, a loro volta di vario istotipo. Ma possono anche essere, indirettamente, espressione di una lesione squamosa, trattandosi di cellule che desquamano al confine con la lesione squamosa, con atipie reattive.

Nel caso delle lesioni ghiandolari non è sicuramente afferabile un continuum tra le lesioni ghiandolari displastiche o neoplasie intraepiteliali ghiandolari di basso grado, quelle di alto grado, l'AIS, l'adenocarcinoma microinvasivo e quello invasivo, come invece avviene per le lesioni squamose. Peraltro, esistono differenze terminologiche tra i vari Autori nell'ambito delle lesioni preneoplastiche, dove i termini displasia ghiandolare e neoplasia intraepiteliale ghiandolare cervicale si riferiscono a diagnosi scarsamente riproducibili (118). Sono stati anche proposti ultimamente nuovi score diagnostici basati sull'atipia nucleare, sulla stratificazione cellulare, sulla entità delle mitosi e dell'apoptosi, per aumentare l'uniformità diagnostica (119), anche se gli stessi Autori ne raccomandano l'uso non in clinica ma solo a scopo di ricerca (120), per identificare i precursori e la storia naturale dell'AIS.

La nuova classificazione delle alterazioni cellulari al pap test di Bethesda del 2001 cerca di fare chiarezza e migliorare la riproducibilità di tali referti, pertanto modifica la classificazione delle anomalie delle cellule ghiandolari e ne considera la derivazione endocervicale o endometriale. Inoltre, in relazione all'alto valore predittivo positivo (VPP) delle AGC ne elimina sia la precedente categoria

“probabilmente reattivo” sia il termine “di incerto significato”, anche per evitare la possibile induzione di comportamenti simili a quelli per l’ASCUS. Pertanto, nella nuova classificazione Bethesda si differenziano all’interno delle AGC le forme non altrimenti specificate (AGC-NOS) e quelle suggestive di neoplasia (AGC vs neoplastiche) e si introduce la categoria “probabile adenocarcinoma in situ - AIS”. Tra le anomalie in cellule epiteliali resta la categoria “adenocarcinoma invasivo”, di tipo endocervicale, endometriale, extrauterino o non altrimenti specificato (68). La differenziazione tra AGC-NOS e le AGC vs neoplastiche ha la sua ragione d’essere in relazione al rispettivo diverso significato prognostico. Infatti nelle AGC-NOS le successive indagini sono negative nel 65% dei casi, mentre nel 26% viene rilevata una SIL (in quasi la metà dei casi di alto grado) e un AIS nel 2% dei casi, mentre in un altro 2% si riscontra un adenocarcinoma endocervicale invasivo e nel 5% dei casi un adenocarcinoma endometriale. In presenza invece di AGC verosimilmente neoplastiche mentre la frequenza SIL permane attorno al 20% (ma con una frequenza tra queste di lesioni di alto grado fino al 70% dei casi) quella di AIS può giungere al 48% e possono essere presenti adenocarcinomi endocervicali invasivi fino al 12% dei casi. Questo diverso VPP tra le due categorie ne giustifica la diversa classificazione (121,122).

Secondo altri Autori in presenza di AGC vs neoplastiche la possibilità di riscontrare una neoplasia maligna andrebbe dal 18,2% per età inferiore a 35 anni al 68% in donne di età superiore a 55 anni (123), suggerendo in tutti i casi protocolli diagnostici intensivi. Nelle donne in menopausa la frequenza di AGC sarebbe simile a quella delle donne in premenopausa, ma sarebbe molto più alta (fino al 54%) la possibilità di riscontrare un adenocarcinoma, più frequentemente endometriale che



endocervicale, nel successivo percorso diagnostico o al follow-up, mentre nel 26 % verrebbe poi riscontrata una H-SIL (124).

Una recente critica all'introduzione dall'AIS tra le categorie citologiche nella classificazione di Bethesda 2001 riporta in un lavoro di review tra esperti fino al 12% di falsi negativi e una corretta interpretazione solo nel 46% dei casi (125), con un'accuratezza diagnostica molto più bassa che per le altre lesioni di alto grado.

Per contro, la correlazione tra AGC vs neoplastiche e la diagnosi finale è risultata statisticamente significativa, come pure quella tra AGC vs endocervicali e la localizzazione di patologia nella cervice (126).

Il VPP delle AGC o delle AGUS complessivamente considerate in letteratura è riportato con variazioni molto ampie: dal 9 al 54% per la SIL, dallo 0 all'8% per l'AIS, dall'1 al 9% per l'adenocarcinoma invasivo (117,122,124,127,128) ma uno studio recente riporta un VPP complessivo per lesioni ghiandolari (almeno L-GIN – low grade glandular intraepithelial neoplasia) e squamose (almeno HSIL) del 72% (55,7% per sole lesioni squamose) (129).

Le ACG quindi possono essere sia l'indice di una lesione ghiandolare ma possono anche essere un fenomeno di accompagnamento di una lesione squamosa: in questo caso si tratta di cellule che desquamano al confine con la lesione squamosa, con atipie reattive alla stessa. È stato infatti dimostrato che le cellule ghiandolari benigne adiacenti alle lesioni squamose presentano una percentuale di positività al MIB1 simile a quella dell'epitelio ghiandolare endocervicale neoplastico (130). Inoltre, in caso di H-SIL la presenza di AGC sarebbe indicativa di un interessamento degli sfondati ghiandolari da parte della CIN (5 volte più frequente rispetto ai casi senza AGC) (131).

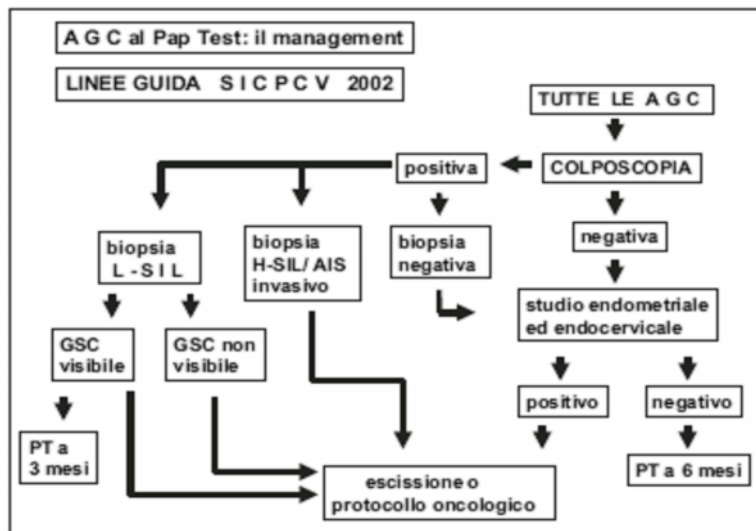
Non va però dimenticato che i due tipi di lesioni, squamose e ghiandolari, possono coesistere e che entrambe possono derivare dalle stesse cellule di riserva totipotenti.

La prima tappa diagnostica in una paziente con ACG sarà, alla luce di quanto sopra descritto e in accordo con le linee guida della SICPCV (132) e della ASCCP (80,133) l'invio a colposcopia. Per altri Autori in tutte le donne con AGC dovrebbe essere studiata in prima battuta sempre anche l'endocervice (117,134) mediante curettage endocervicale e, nelle donne in postmenopausa o con sanguinamenti anomali, deve essere sempre studiato anche l'endometrio. Secondo le linee guida dell'ASCCP le pazienti le cui AGC vengono identificate come cellule endometriali atipiche vengono direttamente indirizzate allo studio della cavità endometriale.

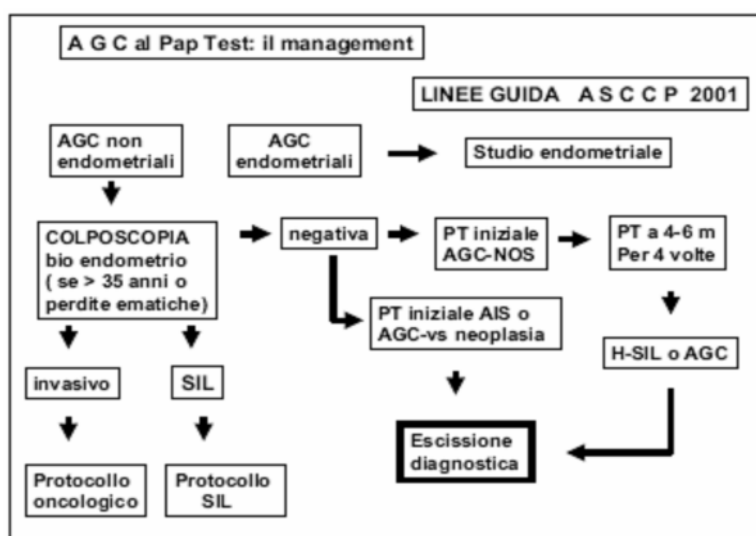
L'invio a colposcopia ha inoltre la sua base razionale non solo sulla possibilità di identificare le lesioni squamose che possono aver indotto anomalie in cellule ghiandolari, ma anche sulla frequente localizzazione a ridosso della GSC delle alterazioni ghiandolari e soprattutto dell'AIS. L'istotipo endocervicale sarebbe localizzato in circa il 90% dei casi entro i 5 mm adiacenti alla GSC (135) e l'invasione iniziale di solito avverrebbe a livello della GSC, tranne che per le varianti endometrioide ed intestinale che possono originare più in alto nel canale cervicale (136). Il limite della colposcopia resta la sua scarsa sensibilità per la diagnostica delle lesioni ghiandolari anche quando queste sono localizzate in aree visibili con il colposcopio. Infatti, la presenza di una displasia ghiandolare o di un AIS può essere solo suggerita da reperti comunque aspecifici quali il disordine strutturale delle papille endocervicali, che possono essere ipertrofiche, ramificate, fragili e facilmente sanguinanti. Solo in caso di adenocarcinoma invasivo la colposcopia può essere

suggestiva, anche se non specifica, di quadri diversi che vanno da aree cerebrinoidi che protrudono dal canale, aree ulcerate, erosioni, proliferazioni acetobianche sanguinanti, spesso associate in periferia ai quadri colposcopici (ANTZ G1 e G2) delle lesioni intraepiteliali squamose eventualmente concomitanti (137).

Attualmente la gestione delle donne con AGC al pap test è codificata nel protocollo presente nelle linee guida 2002 della SICPCV (tab. 14). Le linee guida 2001 della ASCCP (tab. 15) prevedono l'invio di tutte le donne con AGC alla colposcopia (tranne quelle con AGC di origine endometriale, che vengono inviate allo studio dell'endometrio); lo studio endometriale è comunque proposto a tutte le donne con AGC ed età >35 anni. Con colposcopia negativa il percorso viene differenziato in relazione alla diagnosi citologica iniziale: per AGC vs neoplastiche viene eseguita l'escissione cilindrica diagnostica, mentre con AGC-nos al pap test la paziente viene sottoposta a follow-up citologico ogni 4-6 mesi per 4 volte, con invio ad escissione se compare H-SIL o AGC. Questa impostazione raccoglie almeno in parte le evidenze della letteratura che pongono un diverso VPP per le AGC-nos rispetto a quello delle AGC vs neoplastiche; ed evidenziano come il loro intrinseco VPP per neoplasia ghiandolare vari con l'età, con un aumento di neoplasie sia endocervicali ma soprattutto endometriali nelle donne meno giovani.



**Tabella 14:** linee guida SICPCV 2002



**Tabella 15:** linee guida ASCCP 2001

Viene qui illustrata una proposta di protocollo che cerca di tener conto di tutte queste variabili e delle più recenti indicazioni della letteratura (144).

In presenza di AGC di qualsiasi tipo al pap test la paziente verrà inviata a colposcopia

a) donna giovane asintomatica con AGC-NOS

1 - con GSC visibile:



- se la colposcopia è negativa (NTZ – Normal Transition Zone): potremo sia studiare il canale cervicale (ad esempio ripetendo un brush endocervicale) sia eseguire un controllo ravvicinato a 6 mesi; se tutto resta negativo, sono consigliabili, secondo l'ASCCP, quattro controlli semestrali prima di far tornare la paziente al ritmo dello screening; in caso di persistenza di AGC citologica saranno indicate tutte le indagini diagnostiche fino all'escissione cilindrica;
- se la colposcopia è positiva: il protocollo sarà determinato dall'esito della biopsia: trattamento escissionale in caso di AIS o H-SIL; protocollo oncologico adeguato in caso di invasivo squamoso o ghiandolare; trattamento escissionale o follow up stretto (controllo a tre mesi) in caso di CIN1 (che potrebbe essere una lesione di accompagnamento). In quest'ultimo caso dopo il controllo a tre mesi seguiranno controlli semestrali e, in accordo con la ASCCP, prima di tornare al ritmo dello screening sarà consigliabile eseguire controlli semestrali negativi per almeno due anni.

2 - con GSC non visibile:

in ogni caso dovrà essere studiato l'endocollo, e, in presenza di persistenza citologica, si dovrà arrivare anche all'escissione cilindrica diagnostica.

b) donna di età superiore a 35 anni con AGC-NOS

- indipendentemente dall'esito della colposcopia è indicato lo studio del canale cervicale;
- per persistenza, anche a GSC visibile, sarà indicato, dopo le altre metodiche, anche lo studio della cavità endometriale e l'escissione cilindrica diagnostica cervicale.

c) presenza di AGC vs neoplastiche

indipendentemente dall'età è indicato lo studio del canale cervicale; in presenza di negatività nel canale, in considerazione anche della bassa affidabilità della diagnosi citologica, soprattutto in donne giovani, potrebbe essere indicata la revisione del preparato iniziale da un gruppo di esperti prima di procedere all'escissione diagnostica. Sopra i 35 anni e tanto più in menopausa è indicato lo studio della cavità endometriale.

d) donna sintomatica con AGC (perdite ematiche atipiche...)

a qualsiasi età è indicato lo studio sia dell'endocervice che della cavità endometriale, fino all'escissione cilindrica diagnostica cervicale.

I protocolli diagnostico-terapeutici per le pazienti con AGC al pap test o comunque con diagnosi cito-istologica di lesione ghiandolare sono in continuo divenire, mediati sia dalle poche certezze sia dalle numerose voci discordi e alle volte contrastanti che ancor oggi la letteratura internazionale è in grado di offrire. Va ricordato che l'affidabilità diagnostica citologica in questo settore è notevolmente più bassa che per le lesioni squamose, che la colposcopia è poco sensibile per le lesioni ghiandolari anche quando l'epitelio cilindrico è visibile. Inoltre, sono poco sensibili gli attuali metodi di studio dell'endocollo, e anche i concetti "istologici" relativi alle lesioni preinvasive ghiandolari non sono così sicuri e uniformi come per le lesioni squamose. La riflessione costante, critica, basata sull'"evidence based medicine" delle linee guida in questo ambito può essere difficile e lasciare comunque spazi notevoli di incertezza. È doveroso ricordare, malgrado questi livelli di incertezza, la necessità di essere radicali sulle lesioni potenzialmente evolutive nel massimo

rispetto delle strutture sane, optando sempre quando possibile per interventi conservativi, rispettosi dell'integrità psicofisica della paziente.

## **Adenocarcinoma della cervice uterina, in situ e invasivo**

L'adenocarcinoma si riscontra nel 15-20% dei casi di tumore della cervice uterina, origina dall'epitelio cilindrico e presenta numerose varianti (tab. 16). Tra gli adenocarcinomi mucinosi invasivi il 70% è di istotipo endocervicale, in piccola percentuale sono di istotipo intestinale, raramente di istotipo villoghiandolare (ricordano gli adenomi del colon, forse sono correlati all'uso di estroprogestinici). Poco meno del 30% degli adenocarcinomi sono di istotipo endometrioidale, di cui è spesso difficile stabilire la primitività. Vanno ricordati, anche se più rari, i tumori a cellule chiare, gli adenocarcinomi sierosi, quelli di derivazione mesonefrica, il carcinoma adenosquamoso, il carcinoma adenoido-cistico, alcuni tumori neuroendocrini.

---

### **Adenocarcinoma**

- Adenocarcinoma mucinoso
  - Tipo endocervicale
  - Tipo intestinale
  - Tipo anello con castone
- Adenocarcinoma endometrioidale
  - Adenocarcinoma endometrioidale con metaplasia squamosa
- Carcinoma a cellule chiare
- Carcinoma minimamente invasivo
  - Tipo endocervicale (adenoma maligno)
  - Tipo endometrioidale
- Adenocarcinoma villo-ghiandolare ben differenziato
- Adenocarcinoma sieroso
- Carcinoma mesonefrico

---

**Tabella 16:** Classificazione istologica della WHO del carcinoma invasivo della cervice uterina



L'attenzione verso la patologia ghiandolare neoplastica preinvasiva ed invasiva dell'endocervice è aumentata negli ultimi decenni in relazione all'aumentata frequenza dell'adenocarcinoma.

Tale aumento di frequenza è stato segnalato in molti Paesi sviluppati, e solo ultimamente è stato confermato per alcune aree italiane servite da Registri Tumori (per le zone di Firenze e Prato: +5.7% per l'adenocarcinoma; - 1.9% per le forme squamose nel periodo 1985/2000); tale aumento di frequenza è significativo per le donne con età inferiore ai 55 anni. Alcuni autori hanno imputato tale incremento ad un aumentato impiego di contraccettivi orali; altri autori lo hanno attribuito all'attuazione degli screening per il carcinoma della cervice uterina, anche se, la citologia è più sensibile nel rilevare le lesioni preinvasive squamose rispetto a quelle ghiandolari (138).

E' possibile definire tre gradi di lesioni preinvasive endocervicali: l'iperplasia ghiandolare reattiva, secondaria a radioterapia o infiammazione; l'iperplasia ghiandolare atipica, che a sua volta si distingue in basso e alto grado, e la neoplasia cervicale intraghiandolare o adenocarcinoma in situ.

La forma preneoplastica, intraepiteliale, delle lesioni ghiandolari della cervice uterina è l'adenocarcinoma in situ (AIS) che risulta meno frequente rispetto alla corrispettiva lesione squamosa: rapporto AIS/CIN3 varia tra 1:25 e 1:237 nelle varie casistiche. Variazioni di frequenza nelle varie casistiche sono anche da ascrivere, come già detto, alle controversie classificative delle neoplasie intraepiteliali ghiandolari endocervicali e alla scarsa riproducibilità delle diagnosi. Non esiste infatti tra i diversi autori un accordo sulla classificazione delle lesioni ghiandolari intraepiteliali cervicali e sul loro potenziale evolutivo (139), e anche gli score

diagnostici proposti non vengono raccomandati dagli stessi autori per l'uso clinico ma solo a scopo di ricerca.

Analogamente alla CIN è stata descritta la neoplasia intraepiteliale ghiandolare (CIGN) di grado I, II e III: per alcuni autori la CIGN 3 e l'AIS coincidono, per altri si tratta di entità distinte. Comunque, l'AIS, sembra oramai accertato, risulta essere il precursore di gran parte degli adenocarcinomi cervicali invasivi (139).

L'incidenza in aumento negli ultimi anni è stata messa in relazione alle migliori capacità di identificare le lesioni, alla diffusione degli HPV ad alto rischio (HPV18 e non solo) (140) e forse, con un meccanismo non chiaro, anche all'uso dei contraccettivi orali (141).

L'età media di riscontro dell'AIS va dai 32 ai 40 anni, tuttavia, questo dato non è preciso dati i limiti dovuti alla scarsa numerosità delle casistiche e alle difficoltà classificative. Fino a quasi il 68% dei casi di AIS possono essere riscontrati in donne di meno di 35 anni (142).

Il percorso che porta alla diagnosi di AIS può essere vario. La citologia presenta una scarsa sensibilità, anche a causa di errori del campionamento (143): solo tra il 38 ed il 69% dei casi viene segnalato dal pap test (142). Inoltre, spesso, questo referto non viene confermato dalle indagini di II livello per la scarsa sensibilità della colposcopia per le lesioni intraepiteliali ghiandolari (144).

Fino al 50% degli AIS può essere un reperto inaspettato in biopsie o in pezzi istologici di conizzazioni eseguite per il riscontro di lesioni squamose di alto grado o invasive. Fino al 5% delle donne conizzate per lesione squamosa di alto grado presenterebbe una lesione di alto grado ghiandolare- AIS occulta sincrona (145), mentre fino al 30% degli AIS sarebbe accompagnato da lesioni squamose (142). Più

raramente l'AIS viene riscontrato occasionalmente in uteri asportati per patologia benigna, oppure durante il percorso diagnostico in donne con sanguinamenti anomali.

Sono presenti almeno quattro varianti istologiche dell'AIS: l'istotipo classico endocervicale, il più frequente; quello intestinale e l'endometriode, più raro ed, infine, quello tubarico. È stato dimostrato che l'istotipo endocervicale dell'AIS insorge a ridosso della zona di trasformazione in oltre il 90% dei casi, e che si estende prossimamente per continuità all'interno del canale cervicale (135). La variante endometriode e, soprattutto, quella intestinale possono originare in un punto più alto del canale cervicale e pertanto può sfuggire ad un esame colposcopico soddisfacente e negativo. In letteratura sembra che sia molto raro il riscontro di lesioni che raggiungano i 20 mm dalla zona di trasformazione. In letteratura sono espressi pareri discordi circa la diversità di prognosi in relazione ai diversi istotipi (139,144).

La possibilità di evoluzione verso l'adenocarcinoma invasivo è riportata in letteratura ma è difficilmente quantificabile: il riscontro di invasivi dopo conizzazione è raro, e può avvenire sia in presenza di margini liberi che di margini positivi, e viene riferito a distanza fino a 7 anni dalla conizzazione facendo pensare alla possibilità di una nuova malattia più che alla progressione di lesioni preesistenti (146-148).

L'invasione iniziale nei casi evolutivi avverrebbe di solito a livello della GSC tranne per le varianti endometriode e intestinale che potrebbero originare più in alto nel canale cervicale (136).

Le maggiori difficoltà nella diagnosi istologica di AIS sono l'esclusione di una possibile infiltrazione, la diagnosi differenziale con lesioni benigne, quali la metaplasma tubarica, cerviciti, reazione di Arias Stella, residui mesonefrici e l'iperplasia microghiandolare (frequente proprio nella donna giovane e che utilizza contraccettivi orali e che regredisce dopo la loro sospensione), la differenziazione dai possibili precursori: displasie, iperplasia atipica.

La diagnosi citologica impone lo studio del canale cervicale, con i noti limiti di affidabilità delle metodiche di indagine a disposizione; se questo è negativo, in considerazione anche della bassa affidabilità della diagnosi citologica, soprattutto in donne giovani, potrebbe essere indicata la revisione del preparato iniziale da un gruppo di esperti prima di procedere all'escissione diagnostica. Peraltro, è solo l'esame istologico dell'intera lesione che permette di effettuare la diagnosi di certezza di AIS come pure di indirizzare la terapia successiva (isterectomia radicale o meno) in caso di invasivo. Essendo quindi, una patologia di difficile inquadramento, alcuni Autori hanno proposto di eseguire una conizzazione per poter fare una adeguata diagnosi o, in alternativa, un accurato studio dell'endocollo.

La conferma di AIS sul cono a margini liberi permetterà di considerare la conizzazione trattamento definitivo in donne giovani o che non abbiano ancora concluso il loro percorso riproduttivo, sempre che venga consapevolmente garantito il follow-up, mentre con margini positivi dovrà essere eseguito un recondo.

La resezione deve tendere ad essere completa: un'altezza di 25 mm dovrebbe escindere la maggior parte degli AIS in margini indenni (135) anche se resezioni superiori a 20 mm di altezza potrebbero comportare una maggior frequenza di esiti stenotici.



Dati non recenti riportano come in donne di età inferiore ai 36 anni, l'estensione della lesione nel canale cervicale sembra essere significativamente inferiore. La resezione potrebbe così essere modulata ed essere quindi minore al fine proprio di minimizzare il rischio di stenosi.

Il significato dello stato dei margini nel cono in donne con AIS è fonte di dibattito. Donne isterectomizzate precocemente dopo il cono con margini positivi presentavano AIS residuo nell'utero asportato; comunque in letteratura il residuo di malattia nell'utero asportato viene segnalato fino al 23% anche se con margini del cono negativi (149-151) e fino al 56-67% in presenza di margini positivi. Inoltre, in pazienti con margini positivi può essere riscontrato nell'utero asportato una lesione già invasiva (150). Sebbene il rischio di adenocarcinoma invasivo nel follow-up sia maggiore rispetto alle donne della popolazione generale non sembra corretto impostare una terapia più aggressiva solo in ragione di questi pochi casi riportati (142). Anche quando si considerino le pazienti sottoposte a terapia conservativa, la possibilità di recidiva può arrivare quasi al 10% nei casi con margini negativi e fino al 30% in caso di margini positivi. Inoltre, tra le donne che avevano margini negativi le recidive sono state sempre in situ, mentre pazienti con margini positivi avrebbero un rischio aumentato non solo per recidiva di AIS ma anche per un adenocarcinoma invasivo (152). Ci sono però anche autori che non trovano differenze nella percentuale di recidive in relazione allo stato dei margini, e che si pongono il dubbio che il basarsi sullo stato dei margini possa portare a reinterventi (spesso isterectomie) inutili (142) e che considerano la conizzazione associata ad un attento follow-up come un metodo sicuro indipendentemente dallo stato dei margini. A sostegno di questa linea volta ad eliminare isterectomie inutili è stato osservato che esiste una

grande discrepanza in letteratura tra l'alto numero di casi con malattia residua nell'utero asportato a breve dal riscontro di AIS con margini positivi sul cono, e il basso numero di casi con recidiva di malattia a distanza di casi analoghi sottoposti solo a followup, in una condizione che sembrerebbe ripetere quanto già osservato per i coni con margini positivi nelle lesioni squamose intraepiteliali di alto grado.

È infatti ipotizzabile che anche per l'AIS i processi riparativi e flogistici post-conizzazione possano eliminare i residui eventuali di AIS sui margini cruentati.

Dall'insieme dei dati in letteratura ci sembra di poter consigliare il recondo nei casi con margini positivi per AIS, evitando di ricorrere all'isterectomia nella donna in età fertile. Il management dopo il completamento del programma riproduttivo non è standardizzato, ci sono autori che ancora raccomandano l'isterectomia come trattamento definitivo, più sicuro di un follow-up che dovrebbe essere molto prolungato nel tempo.

Alla donna in perimenopausa o in menopausa, con margini indenni sul cilindro escisso può essere proposto il follow-up solo in presenza di una adesione consapevole allo stesso dopo adeguata informazione sulle possibilità di recidiva e sulle difficoltà diagnostiche del follow-up stesso; negli altri casi è consigliabile l'isterectomia. (anche a margini liberi sul cono la frequenza di recidive è attorno al 10% 32).

In caso di terapia conservativa il follow-up dovrà prevedere lo studio del canale mediante citologia con brush e curettage del canale cervicale ed essere almeno semestrale per 2 anni e quindi annuale per almeno i 5 anni successivi, anche se la comparsa di recidive tardive (recidive o nuove malattie?) impone un follow-up molto più prolungato.

## ADENOCARCINOMA INVASIVO

In presenza di superamento della membrana basale l'adenocarcinoma cervicale viene stadiato analogamente a quanto previsto per i carcinomi squamosi. Attualmente è in vigore la stadiazione FIGO di Montreal 1994 (pubblicata nel 1995) (153). Tuttavia, le precise codificazioni che definiscono la microinvasione (stadio IA1 e IA2) e differenziandola dallo stadio IB, valide per le lesioni squamose, non sono sicuramente altrettanto chiare per le lesioni ghiandolari, anche se, vale sempre il principio che la profondità di invasione (154) e il volume tumore (155) sono in relazione alla sopravvivenza.

Tra le difficoltà ci sono la minor frequenza di lesioni ghiandolari "microinvasive" rispetto a quelle squamose, con casistiche generalmente esigue che possono non permettere conclusioni generalizzabili. Viene anche ricordata la scarsa riproducibilità delle misurazioni dell'invasione stromale, data dalla presenza di ghiandole endocervicali normali nello stroma, e le diverse opinioni, non ancora definitivamente chiarite, sulla possibile diversa aggressività delle lesioni ghiandolari rispetto a quelle squamose (156,157). Solo recentemente sono comparsi studi che valutano adeguatamente la possibilità di metastasi linfonodali e parametriali in relazione al volume tumore degli adenocarcinomi microinvasivi, gli unici che ci possono chiarire la possibilità di eseguire terapie conservative in queste pazienti (158,159).

Anche per l'adenocarcinoma invasivo, come per quello in situ, sono presenti diversi istotipi che possono essere interpretati anche come malattie diverse, non solo come patogenesi ma anche come prognosi: gli adenocarcinomi mucinosi, i più frequenti, comprendenti l'istotipo classico endocervicale, (circa il 70% di tutti gli adenocarcinomi endocervicali invasivi), e quelli endometrioide, intestinale,

villoghiandolare, il “minimal deviation adenocarcinoma” o adenoma maligno – che non è HPV correlato. Più rari gli istotipi sierosi, a cellule chiare, e mesonefrici. Sono segnalate anche forme adeno-squamose. Le forme villoghiandolari sono generalmente a sviluppo esofitico, con solo moderata atipia citologica e a buona prognosi ma in casi con foci scarsamente differenziati o associati ad altri istotipi la prognosi può essere peggiore; l’infiltrazione degli spazi linfovaskolari può essere non trascurabile con possibile interessamento linfonodale conseguente anche allo stadio IA.

Va notato come siano emerse recentemente segnalazioni dell’associazione tra l’iperplasia ghiandolare lobulare endocervicale, una lesione pseudoneoplastica considerata benigna non correlata all’HPV, e l’adenocarcinoma invasivo sia di tipo mucinoso che di tipo endocervicale, e come in questi casi le lesioni neoplastiche associate fossero tutte distanti dalla zona di trasformazione e localizzate prevalentemente nella parte craniale del canale cervicale (160). Di contro, nella maggior parte dei casi di adenocarcinoma di istotipo endocervicale l’infiltrazione avviene a ridosso della GSC.

In presenza di lesioni allo stadio FIGO IA1- IA2, in donne giovani desiderose di prole, che accettino consapevolmente il follow-up, la conizzazione con margini liberi (anche da AIS) può essere considerata trattamento definitivo. Si deve tenere presente che i margini di resezione negativi anche in questo caso non garantiscano da una recidiva di AIS (circa 10%) e anche, raramente, di adenocarcinoma invasivo: però la frequenza di recidive non sarebbe diversa da quella riscontrata nelle donne trattate conservativamente per AIS (159). Un recentissimo studio di Balega valuta 48 casi allo stadio IA (IA1 + IA2) e 36 allo stadio IB1: tutte le pazienti sono state sottoposte



ad isterectomia radicale con linfadenectomia pelvica. Va precisato che, a sottolineare la difficoltà di stadiazione, l'esatta definizione dell'infiltrazione stromale è stata possibile solo su 84/98 pazienti che erano entrate nello studio. Nei casi allo stadio IA non è mai stata riscontrata positività parametricale o linfonodale, e nessuna paziente ha sviluppato recidiva, mentre la positività linfonodale è stata di 8/36 pazienti allo stadio IB1, con 6/36 recidive, con una differenza tra gli stadi fortemente significativa (158). Tuttavia, va ricordato che non sono reperibili sufficienti dati in letteratura per suggerire il trattamento conservativo allo stadio IA2, e che anche allo stadio IA1 senza infiltrazione degli spazi linfovaskolari sono stati segnalati casi di recidiva (157). Mentre sta emergendo come istotipi diversi (endometrioidi, intestinale) potrebbero necessitare di approcci terapeutici diversi, anche per la diversa localizzazione nel canale cervicale e per la diversa prognosi, con diversa possibilità di trattamento conservativo, peraltro le casistiche relative a questi istotipi sono poco numerose e non permettono di dare indicazioni sicure.

In tutti gli altri casi, donne in menopausa, perimenopausa, senza desiderio di prole, è indicata l'isterectomia anche allo stadio IA1; non ci sono dati in letteratura che suffraghino l'esecuzione dell'isterectomia radicale andando a demolire quindi i parametri, allo stadio IA (158,161). Sempre allo stadio IA non è stata mai riscontrata metastatizzazione ovarica -0/155 casi (60) e 0/48 casi, per cui in caso di isterectomia in donna in età fertile non è indicata l'asportazione delle ovaie. A mettere qualche dubbio in proposito è la recentissima segnalazione del riscontro sincrono o metacrono ad un adenocarcinoma di tipo endocervicale di un tumore ovarico, generalmente ritenuto primitivo, ma rivelatosi poi correlato alla neoplasia cervicale in seguito alla positività di entrambi i tumori per la p16 e per lo stesso tipo di HPV

63: questo studio riporta 10 casi, di cui 2 in presenza di adenocarcinoma endocervicale microinvasivo (stadio IA1); peraltro la coesistenza dell'infezione da HPV di per se non indica che la malattia ovarica sia una "metastasi" di quella endocervicale.

Purtroppo dobbiamo constatare che le nostre conoscenze non sono in grado di garantirci un outcome sempre positivo in tutti i casi di pazienti affette da adenocarcinoma microinvasivo, e che sono state descritte metastasi linfonodali, recidive e morti anche in casi con infiltrazione fino ad 1 mm, anche se molto rari, e anche se era stata fatto un intervento radicale.

Esiste quindi un rischio residuo attualmente non sicuramente eliminabile, ma che proprio per questo non giustifica assolutamente il ricorso ad interventi radicali nei casi dove questi non siano chiaramente indicati.

## **Il canale cervicale come estensione della patologia neoplastica endometriale**

Il carcinoma dell'endometrio è la seconda neoplasia maligna più frequente dell'apparato genitale femminile, rappresentando l'8-10% di tutti i carcinomi invasivi nelle donne (162) ed il tumore ginecologico più frequente nei Paesi Occidentali. I tassi di incidenza e mortalità riportati a livello mondiale mostrano una grande variabilità geografica: la sua incidenza è di gran lunga maggiore nei paesi industrializzati quali Stati Uniti, Canada e paesi dell'Europa Occidentale, mentre è nettamente inferiore nei paesi del Sud-est asiatico, in Africa e nei paesi latino-americani. Ogni anno i casi di carcinoma endometriale ed i decessi per questa malattia sono rispettivamente 142.000 e 42.000 nel mondo, 25.000 e 9.000 in Europa. In Italia, l'incidenza del carcinoma endometriale è pari al 5-6% dei tumori femminili con circa 4-5.000 nuovi casi anno con 1.700 decessi (163).

Inoltre, il tasso di incidenza del carcinoma endometriale sembra essere influenzato, nell'ambito dello stesso gruppo razziale, anche dall'area geografica in cui si vive. Ad esempio, nelle donne bianche che vivono negli USA il tasso è molto più alto rispetto alle donne della stessa razza che vivono in altri paesi. Le differenze razziali e geografiche suggeriscono che l'insorgenza del carcinoma dell'endometrio è influenzata sia dal patrimonio genetico che da fattori ambientali (163).

Il carcinoma endometriale insorge in epoca pre e post-menopausale, con una prevalenza maggiore in età post-menopausale, con incidenza massima tra i 55 ed i 65 anni per poi stabilizzarsi negli anni successivi.

In base ai dati epidemiologici e clinici il carcinoma dell'endometrio viene distinto in due tipi, uno correlato agli estrogeni (tipo I) e uno indipendente (tipo II). Il

tipo I, più frequente (~80%), è in genere preceduto da una iperplasia endometriale (fig. 21).

La Society of Gynecologic Pathologists (Silverberg 1998) (164) ha proposto che l'iperplasia endometriale debba essere classificata in tre gruppi:

- iperplasia semplice;
- iperplasia complessa;
- iperplasia atipica.

Nell'*iperplasia semplice* l'endometrio è proliferativo e mostra alcune alterazioni nell'architettura ghiandolare e nella forma, che includono ghiandole dilatate e cistiche. L'epitelio ghiandolare è usualmente stratificato, con grande variabilità di attività mitotica, ma senza atipie epiteliali. Lo stroma è anch'esso iperplastico e spesso contiene vasi evidenti, con trombi di fibrina.

Nell'*iperplasia complessa* vi è un relativo aumento nella proporzione di ghiandole endometriali rispetto allo stroma. Le ghiandole hanno un'architettura complessa, con aspetto affollato e con poco stroma. L'epitelio è generalmente stratificato e l'attività mitotica marcata.

L'*iperplasia atipica* è caratterizzata da atipia cellulare con ghiandole che mostrano un aumento nucleolare, pleomorfismo, accumuli di cromatina e nucleoli prominenti. L'epitelio è generalmente stratificato con perdita di polarità e con una marcata attività mitotica (165).

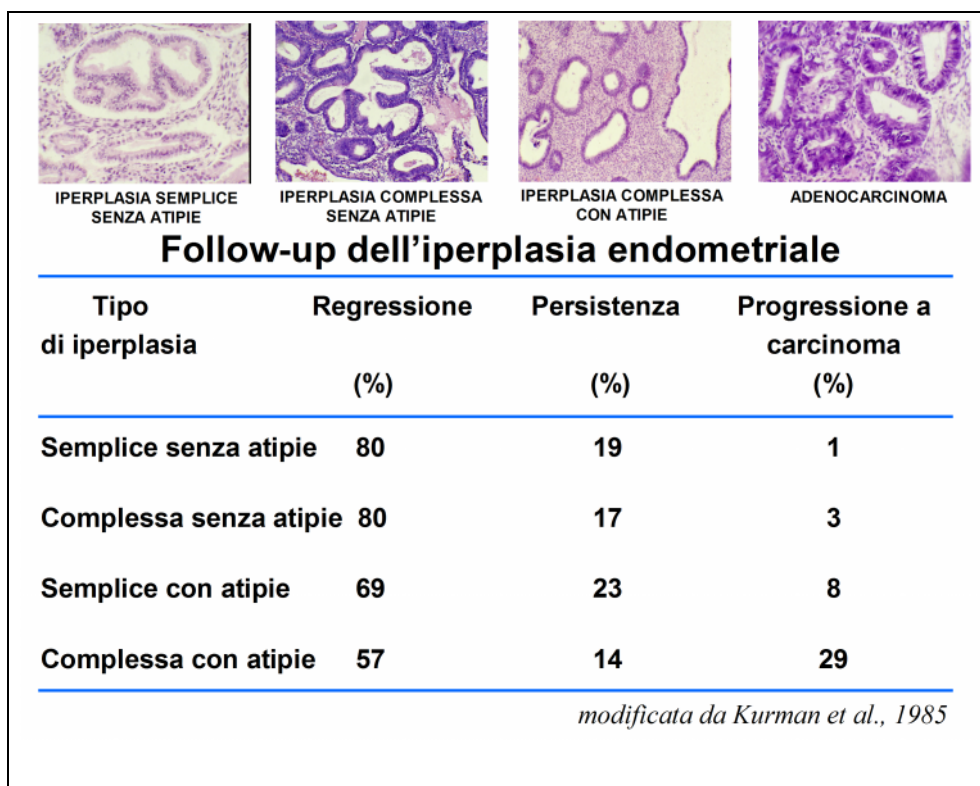
Il carcinoma endometriale di tipo I ha alcune caratteristiche peculiari: insorgenza preferenziale in età perimenopausale; associazione con un'esposizione eccessiva a estrogeni. Sulla base di questa osservazione è stata ipotizzata l'interazione tra assetto ormonale della perimenopausa o della menopausa ed insorgenza di carcinoma



endometriale; in particolare sembrerebbe rilevante la condizione di iperestrogenismo relativo presente nel periodo precedente l'insorgenza della menopausa. Ad un identico meccanismo di insorgenza sarebbero da far risalire i fattori di rischio maggiormente osservati: sterilità, anovulazione, irregolarità mestruali, assunzione di terapie estrogeniche non bilanciate da progestinici, parità, età avanzata, obesità. L'istotipo più frequente è l'adenocarcinoma endometrioide (166,167), generalmente ben differenziato (G1) o moderatamente differenziato (G2) e l'invasione del miometrio è in genere limitata.

Il carcinoma endometriale di tipo II, generalmente insorge su endometrio atrofico o su polipo endometriale, non risulta associato all'esposizione ad estrogeni, interessa donne in postmenopausa e presenta istotipi più aggressivi: carcinoma sieroso, carcinoma a cellule chiare, carcinoma adenosquamoso; la sua prognosi è più sfavorevole. Infatti, tale neoplasia è spesso scarsamente differenziata (G3), biologicamente aggressiva, con infiltrazione miometriale profonda ed elevato potere metastatizzante (167).

Una categoria a parte è rappresentata dal polipo atipico, che consiste in una formazione polipoide endometriale nel cui contesto insorgono atipie citologiche e nucleari tipiche di malignità. Di particolare importanza è la diagnosi differenziale tra carcinoma polipoide (carcinoma endometriale a crescita polipoide) e polipo atipico.



**Figura 21:** Classificazione ed evoluzione dell'iperplasia endometriale

### *Storia naturale e stadiazioni del carcinoma dell'endometrio*

Il carcinoma dell'endometrio può insorgere in qualsiasi punto della cavità uterina e macroscopicamente può presentarsi sotto due forme: circoscritta e diffusa (168,169).

La *forma circoscritta* di solito appare come una formazione polipoide e più raramente come una ulcerazione od un rilievo nodulare limitato ad una precisa area endometriale. Questa proliferazione a differenza dei polipi endometriali benigni è irregolare, friabile, con aspetti necrotico-emorragici. L'infiltrazione in profondità nel miometrio può provocare una erosione progressiva dello spessore muscolare fino ad affiorare alla superficie peritoneale.

La *forma diffusa* occupa di solito gran parte della cavità uterina e può anche essere dovuta all'estendersi di una forma primitivamente circoscritta, che inizia per lo più nel terzo superiore della cavità, oppure può essere dovuta all'origine multicentrica del tumore. L'infiltrazione miometriale nelle forme diffuse o proliferative è meno frequente che nelle forme ulcerative.

Gli *istotipi* del carcinoma endometriale sono molteplici e riflettono le ampie possibilità di differenziazione della cellula ghiandolare di derivazione mülleriana. La classificazione istologica ufficiale del carcinoma dell'endometrio è quella dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (1994). Prevede sette istotipi: adenocarcinoma endometriode, carcinoma sieroso, a cellule chiare, mucinoso, squamocellulare, misto e indifferenziato (tab. 17).

---

<b>Adenocarcinoma endometriode</b>
Con differenziazione squamosa
Adenocarcinoma con metaplasma squamosa
Carcinoma adenosquamoso
Secretivo
Ciliato
<b>Adenocarcinoma mucinoso</b>
<b>Adenocarcinoma sieroso</b>
<b>Adenocarcinoma a cellule chiare</b>
<b>Carcinoma squamoso</b>
<b>Carcinomi di tipo misto</b>
<b>Carcinoma indifferenziato</b>

---

**Tabella 17:** Classificazione istologica della WHO del carcinoma invasivo dell'endometrio

Approssimativamente il 75% degli adenocarcinomi endometriali sono di tipo endometriode e assomigliano all'epitelio ghiandolare endometriale. Mostra uno stretto rapporto con l'iperestrogenismo esogeno ed endogeno, soprattutto nelle forme ben differenziate. Un elevato numero di casi è preceduto da iperplasia con atipie; la

probabilità di progressione verso la neoplasia è stimata ne esistono due rare varianti: quella secretoria e quella a cellule ciliate. In un adenocarcinoma endometrioide aspetti papillari e villoghiandolari possono essere presenti senza per questo costituire una varietà a sé: vanno però valutati criticamente per la diagnosi differenziale con il carcinoma sieroso. Una terza variante dell'adenocarcinoma endometrioide è l'adenocarcinoma con differenziazione squamosa. Si ha quando nell'adenocarcinoma è presente una differenziazione squamosa focale, che può avere caratteri morfoistologici di benignità (adenocantoma) o di malignità (carcinoma adenosquamoso). Attualmente si preferisce riunire i due istotipi nella definizione "adenocarcinoma con differenziazione squamosa", seguita dal grading eseguito sulla componente ghiandolare.

Ci sono tre *gradi* di adenocarcinoma (G1, G2 e G3), in rapporto all'architettura e alle atipie citologiche. I gradi più frequenti sono il G1 ed il G2, mentre il G3 incide per circa il 10% dei casi. Una certa variabilità intersoggettiva nella valutazione istologica del grading è comunque inevitabile.

In generale si osserva che in un tumore ben differenziato la crescita ghiandolare sia mantenuta, mentre in uno meno differenziato una maggiore proporzione del tumore mostra un pattern solido di crescita dell'epitelio. La distinzione tra un carcinoma endometriale ben differenziato e una iperplasia complessa atipica può essere difficile. In teoria essa dovrebbe essere basata sulla identificazione dell'invasione dello stroma, ma in pratica è di difficile valutazione.

Le caratteristiche di un carcinoma endometriale ben differenziato sono:

- una crescita confluyente di epitelio ghiandolare che conduce un pattern cribriforme;

- un pattern di crescita papillare;
- una risposta stromale desmoplastica (fibroplastica) delle ghiandole che invadono;
- in alcuni casi, sostituzione dello stroma con epitelio squamoso.

Questi cambiamenti architetturali sono generalmente associati a quelli citologici che includono l'aumento di volume dei nuclei, accumuli di cromatina e nucleoli allungati.

Istotipo e grading identificati sul materiale biotico in alcuni casi possono essere modificati all'esame del pezzo operatorio. Infatti, è univocamente riconosciuto che un campione da curettage può sottostadiare il tumore quando confrontato con un campione di isterectomia (170).

La *diffusione* del carcinoma endometriale avviene prevalentemente per estensione diretta, verso il miometrio e verso il canale cervicale. Data la lenta crescita del tumore, è rara l'estensione agli altri organi pelvici (vescica, retto), mentre non è infrequente l'interessamento metastatico alle ovaie che principalmente avviene attraverso il drenaggio linfatico della parete tubarica o direttamente, per colonizzazione in tale sede, di cellule neoplastiche esfoliate dal tumore e disseminate attraverso il lume tubarico. Il grado di infiltrazione miometriale costituisce uno degli elementi più importanti nel condizionare la prognosi. Con il progredire dell'infiltrazione neoplastica verso la sierosa del viscere si è evidenziata, infatti, sia una parallela riduzione della sopravvivenza al quinto anno sia una maggiore incidenza di metastasi linfonodali. Ciò rende necessaria una precisa definizione del grado di infiltrazione miometriale al fine di programmare, nei casi a rischio, una adeguata terapia adiuvante.



L'estensione diretta al canale cervicale rappresenta una via di diffusione relativamente frequente (circa il 20% dei casi). Essa assume un ruolo prognostico sfavorevole in quanto può condizionare:

- la diffusione attraverso la ricca rete linfatica propria della cervice uterina;
- la diffusione, per via linfatica o per estensione diretta, alle strutture parametriali;
- la diffusione vaginale.

Le vie di drenaggio linfatico del corpo uterino sono essenzialmente tre:

- linfonodi iliaci esterni, interni, otturatori e iliaci comuni attraverso il legamento largo e ipparametri;
- linfonodi paraortici attraverso il legamento infundibulo-pelvico;
- linfonodi inguinali attraverso il legamento rotondo.

I vasi linfatici, così come avviene per il sistema ematico, costituiscono delle reti anastomotiche tra i due segmenti uterini, corpo e collo, per cui neoplasie a sede o con estensione bassa possono dare ripetizioni linfonodali anche attraverso la rete paracervicale.

La disseminazione per via ematogena, al contrario, è rara ed è ad appannaggio quasi esclusivo di stadi avanzati di malattia. Gli organi più frequentemente colpiti in tale evenienza sono: fegato, polmoni, ossa e cervello.

L'importanza della determinazione della effettiva estensione della neoplasia ai fini di una pianificazione terapeutica ottimale ha indotto la Federazione Internazionale di Ginecologia e Ostetricia (FIGO) (171) a introdurre nel 1988 una nuova procedura di *stadiazione "chirurgica"* del carcinoma dell'endometrio (tab.18), in sostituzione della modalità di stadiazione "clinico-strumentale" in uso dal

1971. La stadiazione “clinica” del cancro dell’endometrio è infatti risultata inaccurata in caso di estensione extrauterina della lesione, particolarmente in caso di metastasi linfonodali, impianti peritoneali e coinvolgimento annessiale.

**Tabella 18:** Stadiazione chirurgica FIGO del carcinoma dell’endometrio

Stadio	Descrizione
<b>Stadio I: il carcinoma è confinato al corpo luteo, incluso l’istmo</b>	
Ia	Tumore limitato all’endometrio
Ib	Invasione di meno della metà dello spessore endometriale
Ic	Invasione oltre la metà dello spessore miometriale
<b>Stadio II: il carcinoma ha coinvolto il corpo e la cervice ma non è esteso fuori dall’utero</b>	
IIa	Coinvolgimento solo delle ghiandole cervicali
IIb	Invasione dello stroma della cervice
<b>Stadio III: il carcinoma è esteso fuori dall’utero ma è confinato alla pelvi</b>	
IIIa	Il tumore invade la sierosa e/o gli annessi e/o citologia peritoneale positiva
IIIB	Metastasi vaginali
IIIC	Metastasi ai linfonodi pelvici e/o para-aortici
<b>Stadio IV: il carcinoma ha interessato la mucosa della vescica o del retto o ha metastasi a disatanza</b>	
IVa	Invasione tumorale della mucosa vescicolare e/o dell’intestino
IVb	Metastasi a distanza incluse quelle intra-addominali e/o ai linfonodi inguinali

Tale stadiazione ha permesso di confermare il ruolo specifico della chirurgia sia ai fini di stadiazione che di trattamento. Infatti, l’intervento chirurgico consente una precisa individuazione di tutti i parametri anatomopatologici di fondamentale significato prognostico (grado, istotipo, infiltrazione miometriale, invasione degli spazi linfo-vascolari, citologia peritoneale, metastasi annessiali e linfonodali) al fine di selezionare le pazienti ad alto rischio di recidiva e porre quindi l’indicazione all’eventuale terapia adiuvante post-chirurgica, evitando inutili e pericolosi sovra o sotto trattamenti.

*Le linee guida FIGO del 2000 raccomandano per la stadiazione chirurgica:*

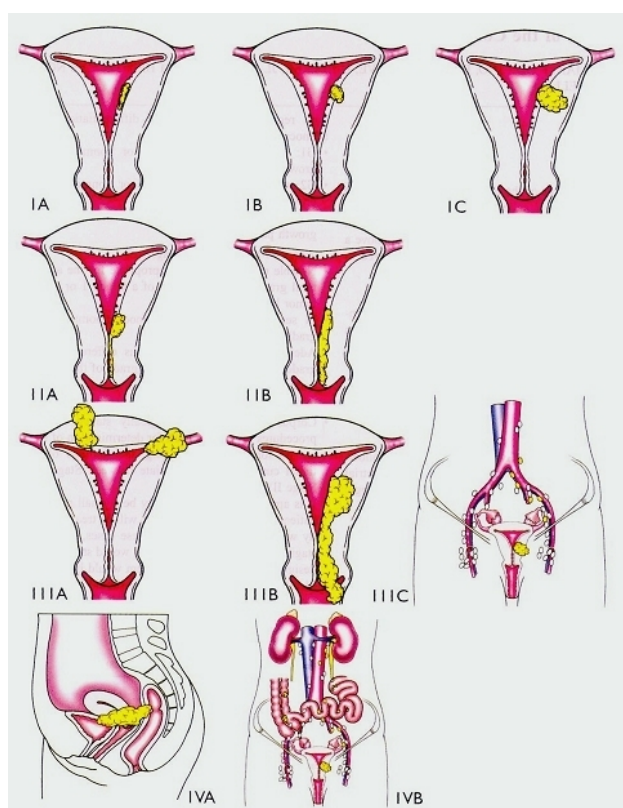
- un'incisione verticale;
- il prelievo di liquido libero peritoneale o lavaggio peritoneale;
- l'accurata esplorazione della pelvi e dell'intero addome;
- l'ispezione e la palpazione delle catene linfonodali pelviche e lombo-aortiche;
- la procedura chirurgica standard di isterectomia totale extrafasciale con annessiectomia bilaterale (anche ad ovaie apparentemente normali);
- è espressamente sottolineato che non è obbligatoria anzi è dubbia l'utilità dell'asportazione del colletto vaginale;
- per quanto attiene la valutazione linfonodale pelvica non è espressamente chiarito se la linfadenectomia debba essere sistematica (almeno 25 linfonodi pelvici e 15 lombo-aortici) oppure limitata ad un sampling linfonodale (asportazione di linfonodi sospetti alle indagini di imaging preoperatorio o alla valutazione intraoperatoria);
- per quanto riguarda i linfonodi aortici è suggerito di effettuare un sampling nei casi sospetti di linfonodi ingrossati in sede aortica o iliaca comune, nei casi con annessi positivi, nei casi con positività sulle linfoghiandole pelviche;
- anche nelle varianti istologiche a cellule chiare, sieroso-papillifero e carcinosarcoma è suggerito provvedere al campionamento dei linfonodi aortici per la particolare storia naturale di queste neoplasie.

Tali linee guida, inoltre, contemplano, basandosi sulle evidenze emerse dalla letteratura mondiale (sopravvivenza in relazione allo stadio – sopravvivenza in relazione al trattamento chirurgico), una modulazione della radicalità chirurgica in relazione allo stadio (tab.19).

Nel I stadio del carcinoma endometriale si distinguono tre sottostadi corrispondenti al grado di infiltrazione del miometrio. Tale fattore prognostico correla con il tasso di metastasi linfonodali osservate e pertanto fornisce una informazione fondamentale nella pianificazione terapeutica. Le attuali indicazioni depongono per la necessità di un trattamento adiuvante alla chirurgia, essenzialmente di tipo radioterapico, solo in casi selezionati nei quali si presentino fattori prognostici negativi quali un basso grado di differenziazione cellulare (G3), infiltrazione della metà esterna del miometrio, stadio IC, istotipo diverso dall'adenocarcinoma endometrioidale o giovane età della paziente. Tradizionalmente si ritiene che una terapia adiuvante sia indicata quando il rischio di recidiva dopo chirurgia è superiore al 10-15%. Lo stadio IA e IB verranno avviate ad un follow-up che prevede controlli clinici ogni 4 mesi per i primi 3 anni e semestrali nei successivi due.

Il trattamento chemioterapico è riservato agli stadi IC degli adenocarcinomi cosiddetti ad "istotipo speciale", ovvero la varietà a cellule chiare e sieroso-papillifero. La tendenza attuale è di considerare tali lesioni assimilabili al carcinoma ovario nel loro comportamento biologico. Pertanto, la chirurgia dovrebbe constare di una isterectomia con annessiectomia bilaterale, washing peritoneale, omentectomia e linfadenectomia pelvica e lomboaortica.

Il carcinoma dell'endometrio in stadio IIA viene ad oggi trattato con intervento chirurgico radicale comprendente l'isterectomia allargata di tipo II secondo la classificazione di Piver, annessiectomia bilaterale ed esame citologico su liquido di lavaggio peritoneale. Resta controverso il ruolo della linfadenectomia sistematica. Infatti, l'incidenza di metastasi linfonodali in questo stadio appare sovrapponibile (5-15%) a quella dello stadio I.



Stadio	Trattamento
I G1- G2	Isterectomia extrafasciale con annessiectomia bilaterale e biopsie dei LFN sospetti
I G3	Isterectomia extrafasciale con annessiectomia bilaterale e linfadenectomia pelvica
II-III	<i>Isterectomia radicale tipo Piver II</i> con linfadenectomia sistematica +/- Radioterapia e/o Chemioterapia
IV e Recidiv a	Radioterapia +/- Chemioterapia +/- Terapia ormonale +/- Chirurgia

**Tabella 19:** Stadiazione chirurgica FIGO 2000 del carcinoma dell'endometrio

In presenza di infiltrazione dello stroma cervicale, stadio IIB, il trattamento chirurgico sarà analogo a quello del cervicocarcinoma. In tal caso, oltre alla necessità di eseguire un'isterectomia radicale, la linfadenectomia rappresenta un momento fondamentale dell'atto chirurgico, non solo per la definizione dello stadio, ma soprattutto per la definizione del rischio e quindi della necessità di un'eventuale terapia adiuvante. La letteratura, infatti, riporta per lo stadio IIB una positività dei linfonodi regionali in percentuali variabili fra il 20 e il 30% (172).

Nel 2006 la FIGO ha individuato le tecniche diagnostiche più efficaci nel fornire il maggior numero di informazioni necessarie per eseguire un corretto trattamento



chirurgico (173). La Federazione Internazionale di Ginecologia e Ostetricia ha così stabilito che:

- per eseguire una *diagnosi istopatologica* della lesione è necessaria una biopsia endometriale che può essere eseguita con tecniche “alla cieca” come Vabra, Pipelle, Novak, dilatazione e curettage o sotto diretta visione con l’isteroscopia;
- per valutare *l’estensione locale del tumore*, ovvero, l’invasione del miometrio e l’estensione al canale cervicale, sono necessarie l’ecografia trans-vaginale e la Risonanza Magnetica con mezzo di contrasto.

Ha inoltre stabilito che:

- il *rischio metastatico* va correlato al grading istologico, all’istotipo, alla profondità di infiltrazione miometriale ed all’estensione all’istmo ed al canale cervicale;
- nella *valutazione del rischio operatorio* rientrano l’età, l’obesità e le condizioni generali;
- per il follow-up e la valutazione di eventuali recidive devono essere impiegati marcatori biochimici e tecniche strumentali, ovvero, Ca 125, USG-TV, TAC, PET.

#### *Diagnostica clinica, strumentale e di laboratorio*

L’esordio clinico del carcinoma dell’endometrio è generalmente rappresentato da un sanguinamento genitale anomalo. Spesso la sintomatologia metrorragica è precoce, così che circa l’80% dei tumori endometriali viene diagnosticato agli stadi iniziali. Una piccola percentuale di pazienti, compresa tra lo 0,5 e 1,5% può rimanere

per lungo tempo asintomatica e la diagnosi viene posta in modo accidentale o tardiva. Un sanguinamento, anche se lieve, in periodo postmenopausale richiede l'approfondimento diagnostico con biopsia. Più difficile è, invece, la valutazione clinica dei sanguinamenti uterini in età fertile ed in climaterio; in tali situazioni, un'attenta anamnesi ed il ricorso all'ecografia transvaginale possono risultare dirimenti. Il dolore e la leucorrea (perdite vaginali bianco-giallastre maleodoranti), legati all'estensione extrauterina della neoplasia e ai fenomeni di congestione, necrosi e colliquazione presenti in modo particolare nelle più grosse vegetazioni polipoidi, possono essere presenti negli stadi più avanzati della malattia.

Tale patologia diagnosticata in uno stadio iniziale ha un'ottima prognosi a 5 anni. L'alto tasso di sopravvivenza dimostra l'importanza di una diagnosi tempestiva e corretta.

Secondo l'American College of Obstetricians and Gynecologists, allo stato attuale, non vi sono indagini diagnostiche non invasive, sufficientemente sensibili e specifiche, da utilizzare per lo screening di pazienti con carcinoma endometriale asintomatico. Tuttavia è possibile identificare una popolazione maggiormente a rischio da sottoporre a prevenzione secondaria, anche se nel 50% dei casi il tumore insorge in pazienti senza apparenti fattori di rischio.

### **Citologia**

La citologia cervico-vaginale ha una bassa sensibilità per la diagnosi di neoplasie dell'endometrio. La sua attendibilità varia, secondo le diverse casistiche, dal 20 al 60%. Il riscontro di cellule endometriali normali nel Pap-test di donne in postmenopausa è nella maggioranza dei casi senza significato clinico (168).

La valutazione citologica endometriale non trova indicazione nella paziente asintomatica. Sono state introdotte diverse metodiche di prelievo citologico endometriale, per ridurre i fallimenti. Lo Jet-wash consiste in un lavaggio della cavità endometriale e quindi in un esame delle cellule asportate; l'endocyt si basa su un'asta di plastica, con due alette, che ruotata raccoglie le cellule della cavità endometriale. L'accuratezza diagnostica per la malignità è elevata (70-90%), ma non ancora sufficiente per individuare i cosiddetti precursori della neoplasia endometriale come le iperplasie (65%).

## **Ecografia**

L'ecografia rappresenta l'indagine di prima scelta nella diagnostica delle perdite ematiche anormali, consentendo uno studio accurato della rima endometriale con l'approccio trans-vaginale (ECO TV)(174). E' convenzione misurare lo spessore totale delle due superfici endometriali nel punto di maggiore altezza in una scansione sagittale.

Esistono diversi cut-off di spessore endometriale che possono essere usati per raccomandare ulteriori indagini diagnostiche. L'utilizzo del cut-off è possibile solo quando la morfologia endometriale è normale, ogni aspetto anomalo, come ad esempio il sospetto di un polipo, richiede ulteriori indagini indipendentemente dal valore dello spessore endometriale. Il più utilizzato è uno spessore massimo di 4 mm nonostante una recente metanalisi abbia evidenziato che gli unici studi di buona qualità considerano uno spessore massimo di 5 mm. La scelta di un cut-off di 4 mm comporta un numero di falsi negativi minore a costo di un maggior numero di falsi positivi, cioè di donne sane sottoposte ad ulteriori accertamenti (174,175).

Le caratteristiche ecografiche suggestive di malignità sono:

- endometrio iperecogeno di elevato spessore: più di 4 mm in post-menopausa e più di 15 mm in pre-menopausa;
- alterazioni macrocistiche;
- limiti indefiniti;

inoltre, l'utero può essere aumentato di dimensioni rispetto ai valori tipici dell'età.

In donne in post-menopausa che riferiscono sanguinamento uterino anomalo la metodica ultrasonografica raggiunge una sensibilità del 95% e una specificità del 55% nella diagnosi della patologia endometriale maligna adottando come cut-off ecografico per lo spessore endometriale il valore di 4-5 mm; la sensibilità raggiunge il 99% se il cut-off ecografico è di 3 mm. L'accuratezza diagnostica della USG TV migliora se complimentata dall'eco color doppler e dalla sonoisterografia, raggiungendo una sensibilità del 96% ed una specificità dell'88%.

Tuttavia, sebbene l'esame ultrasonografico abbia una buona sensibilità nella diagnosi del carcinoma endometriale, più del 50% delle donne in post-menopausa esaminate con l'USG TV necessitano di esami successivi di approfondimento. Inoltre, la sensibilità della USG TV nella diagnosi di carcinoma endometriale è ridotta particolarmente in alcune categorie di pazienti: nelle donne in premenopausa, a causa dello spessore endometriale molto variabile in relazione al ciclo mestruale, o alla presenza di patologia endometriale benigna; in donne sottoposte a terapia con tamoxifene, infatti, in tali casi è frequente il riscontro di polipi endometriali e del caratteristico quadro dell'atrofia cistica che pone problemi di diagnosi differenziale

con il carcinoma dell'endometrio; nelle donne che adottano la terapia ormonale sostitutiva e nelle donne di più di 70 anni perché, il 34% dei casi di carcinoma endometriale di tipo II si associa ad endometrio sottile o difficilmente valutabile ecograficamente.

Il carcinoma endometriale si presenta ecograficamente iperecogeno rispetto al miometrio e questo facilita lo studio dell'interfaccia tra le due superfici. La documentazione dell'esatta estensione al miometrio ha notevole valore prognostico. All'indagine trans-vaginale è possibile valutarne un eventuale coinvolgimento miometriale con una sensibilità, riportata in letteratura, compresa fra il 57 e il 100% (176).

La problematica più difficile da risolvere è il rapporto corpo-cervice; molto spesso è difficile localizzare l'istmo uterino che rappresenta il "punto di frontiera" per definire l'infiltrazione cervicale; i principali punti di repere sono dati dalla mucosa del canale (che in post-menopausa non è purtroppo molto netto), dall'angolo di versione (non sempre è ben definibile, talvolta per fissità del viscere ed esiti aderenziali pregressi) e dalla riflessione della vescica a livello della plica peritoneale vescico-uterina, normalmente lassa e quindi dissociabile dall'utero e dalla vescica (ma aderente per esiti di pregressi tagli cesarei). Data la difficoltà di identificazione dei suddetti punti di repere, si può ben comprendere la non eccelsa sensibilità delle metodiche di imaging riguardo all'infiltrazione cervicale del carcinoma endometriale (177).

Recentemente, tuttavia, l'introduzione di apparecchiature ultrasonografiche capaci di eseguire in tempi relativamente rapidi una acquisizione volumetrica di



blocchi tissutali “tridimensionali” ha determinato un diverso approccio alla patologia uterina e cervicale, colmando in parte il gap tra l’ecografia transvaginale e la risonanza magnetica nucleare. La possibilità di memorizzazione di tali blocchi (voxel) ha inoltre consentito uno studio differito e “multi-operatore” dei casi clinici ed ha permesso un confronto meno impari con altre metodiche.

La possibilità di manipolazione spaziale dell’immagine, la visualizzazione di immagini su piani di sezione “impossibili” da ottenere con le apparecchiature tradizionali, la ricostruzione elettronica tridimensionale del viscere e la visualizzazione tridimensionale dell’albero vascolare hanno impresso un notevole stimolo alla ricerca da parte dei ginecologi oncologi ecografisti, allo scopo di identificare ulteriori parametri.

## **Biopsia endometriale**

### *Curettage endometriale*

Prima dell’introduzione dell’isteroscopia, l’accertamento diagnostico si basava sull’esame istologico del materiale asportato con prelievo con cannula di Novak o con il curettage della cavità uterina che aveva al contempo un effetto terapeutico sul sanguinamento.

Entrambe le metodiche sono eseguite alla “cieca” e quindi in entrambi i casi possono sfuggire lesioni focali; il curettage, infatti, è gravato da un’incidenza di falsi negativi che oscilla tra il 10 ed il 20% mentre il prelievo con cannula di Novak ha una bassa sensibilità per la iperplasia atipica (64%). In più, il curettage necessita di ricovero ospedaliero ed anestesia generale.

### *Biopsia endometriale tramite aspirazione (VABRA)*

Il VABRA è una biopsia endometriale tramite aspirazione. Il sistema Vabra è una cannula di acciaio inossidabile di 24 cm di lunghezza e 3 mm di diametro con una camera per il prelievo del campione situata ad un'estremità. La sonda viene inserita all'interno della cavità uterina e viene eseguita un'aspirazione attraverso una pompa di suzione. La sonda viene poi ruotata per ottenere il campione di tessuto endometriale. Il sistema Vabra garantisce un prelievo adeguato nel 91% dei casi e permette la diagnosi di neoplasie maligne intrauterine nel 95% dei casi.

### *Isteroscopia*

L'isteroscopia per la sua capacità di esaminare la cavità uterina e il canale cervicale con un minimo fastidio per la paziente è diventata una indagine diagnostica fondamentale per lo studio della patologia endometriale.

L'isteroscopia, grazie alla visione diretta, consente di esplorare tutta la cavità uterina, raggiungendo anche quelle aree meno accessibili, come gli angoli tubarici, essa inoltre permette di valutare la topografia e l'estensione della lesione, e quindi la visualizzazione di lesioni focali che con le precedenti tecniche potevano sfuggire, offrendo quindi la possibilità di eseguire una biopsia mirata. Infine, nei soggetti con lesioni endometriali a rischio, permette un valido follow-up.

L'isteroscopia, comunque, è una procedura invasiva e viene pertanto eseguita solo dopo un accurato esame ecografico nell'iter diagnostico della patologia endometriale. Tuttavia, nei casi sopraelencati, nei quali l'indagine ecografia risulta avere una bassa sensibilità, nonché nelle donne in post-menopausa con

sanguinamento uterino anomalo, la tecnica isteroscopica è stata proposta da alcuni Autori come metodica di prima linea, grazie all'attuale semplicità, rapidità di esecuzione e affidabilità.

Numerosi studi, infatti, in letteratura hanno confrontato la diagnosi ottenuta con la visione isteroscopica con quella derivata dai reperti istologici (tab.20):

Accuratezza diagnostica dell'isteroscopia		
Diagnosi isteroscopica	N. casi	Accuratezza
Iperplasia a basso rischio	148	71%
Iperplasia ad alto rischio	32	93%
Adenocarcinoma	55	96%

**Tabella 20:** valutazione della accuratezza diagnostica dell'isteroscopia (Tantini et al.) (178).

In uno studio del 1995, Nasri et al. evidenziano come in 3 casi di pazienti sintomatiche (Abnormal Uterine Bleeding, AUB) con diagnosi di endometrio atrofico dopo ecografia e curettage, l'isteroscopia abbia rilevato lesioni focali da Carcinoma endometriale (179).

Anche Torrejon et al., in uno studio del 1997, su circa 1398 donne con metrorragia, hanno confrontato i quadri isteroscopici con la diagnosi istopatologica per valutare l'accuratezza diagnostica della metodica: in presenza di Adenocarcinoma nelle donne in premenopausa, la sensibilità era del 100%, la specificità del 99.4% e la precisione diagnostica del 99.5%; in postmenopausa tali valori risultarono sovrapponibili. In presenza di iperplasia endometriale essi hanno

riscontrato: per le donne in premenopausa una sensibilità del 71%, una specificità del 96.4% ed una precisione diagnostica del 92.5%; per le donne in postmenopausa, i valori sono stati rispettivamente dell'85.1%, del 100% e del 97.3% (180).

L'esame isteroscopico al giorno d'oggi, è diventato ambulatoriale, poco traumatico e non richiede solitamente anestesia nè dilatazione cervicale. Anche il tasso di fallimento per stenosi cervicale, sinechie cervicoisthmiche, ed intolleranza della pazienti, in virtù della introduzione dei moderni isteroscopi sottili, si è ridotto di molto (tra il 3-5%) (181-183).

Complessivamente, gli aspetti isteroscopici suggestivi di malignità sono:

- colore bianco, grigio-verdastro: il normale colore dell'endometrio varia da rosa pallido a giallastro in accordo con le fasi del ciclo. Un colorito biancastro o bianco-grigiastro dell'endometrio è suggestivo di patologia endometriale maligna;
- aree di necrosi, emorragie e microcalcificazioni: il riscontro isteroscopico di questi reperti è fortemente sospetto di carcinoma endometriale;
- vascolarizzazione atipica: diffusa vascolarizzazione con aspetto ramificato anarchico e disaccordo tra l'asse vascolare principale e la direzione della crescita della lesione;
- superficie irregolare o ulcerata: la presenza di aree ispessite biancastre, una irregolarità di superficie o ulcerazioni, vanno considerati come parametri di sospetto;
- consistenza : la lesione maligna è generalmente di consistenza molle, friabile e facilmente sanguinante al contatto con l'isteroscopio. La consistenza della

lesione viene valutata indirettamente dall'impronta che la punta dello strumento imprime al tessuto.

La corretta descrizione di una lesione di verosimile natura eteroplasica deve tener conto di:

- pattern di crescita tumorale: nodulare, polipoide, papillomatoso. Tuttavia, è stato dimostrato, che la morfologia tumorale non ha una correlazione prognostica significativa;
- l'estensione tumorale intracavitaria: si distingue un tumore ben circoscritto con netta demarcazione dei propri limiti, che si estende a meno della metà della superficie endometriale, da un tumore che mostra una estesa diffusione e che coinvolge più della metà della superficie endometriale. L'estensione intracavitaria del tumore ha rilevanza prognostica, correlando significativamente con lo stadio, il grado e la sopravvivenza (aumento delle dimensioni del tumore, diretto peggioramento della prognosi).
- L'invasione del canale cervicale: lo studio del canale cervicale avviene in uscita, alla fine dell'esame; con il vantaggio che in pazienti reclutate per sospetta patologia cervicale si rilevino anche aspetti patologici a livello della cavità uterina, e viceversa.

I principali parametri isteroscopici sospetti di diffusione della malattia alla cervice uterina sono:

- la presenza di lesioni esofitiche che originano dalle pareti cervicali;
- l'irregolarità della superficie cervicale e dei contorni dell'istmo;
- la vascolarizzazione aumentata e accentuata della mucosa cervicale.



Di fondamentale importanza è la diagnosi differenziale tra la malattia diffusa alla cervice uterina (stadio II) e il carcinoma endometriale che protrude nel canale cervicale senza interessarne le pareti (stadio I). falsi positivi e falsi negativi possono aversi, soprattutto, nei casi di interessamento dell'istmo, in quanto, la corretta visione del limite superiore del canale cervicale può essere difficile soprattutto se vi è sanguinamento in atto.

L'accuratezza diagnostica dell'isteroscopia migliora con l'esecuzione di una biopsia endometriale eseguita sotto diretta visione (mirata) su aree sospette, raggiungendo così una sensibilità del 97.5% e una specificità del 100%.

La letteratura ha naturalmente affrontato anche l'aspetto dei limiti di questa metodica, che consistono essenzialmente nel rapporto costo/beneficio, nella necessità di utilizzare operatori esperti (soggettività della valutazione).

### **Risonanza Magnetica Nucleare**

La risonanza magnetica è la modalità di scelta per la valutazione prechirurgica del carcinoma dell'endometrio per la sua intrinseca risoluzione di contrasto e la multiplanarietà, in quanto permette di valutare contemporaneamente la profondità dell'infiltrazione miometriale, l'eventuale estensione alla cervice uterina e la presenza di linfonodi ingranditi a livello pelvico e lombo-aortico (184,185). A differenza della TC che consente uno studio della pelvi unicamente nelle sezioni assiali. Il protocollo d'indagine maggiormente utilizzato include acquisizioni assiali pesate in T1 anche con soppressione del grasso; assiali, sagittali e coronali pesate in T2; ed acquisizioni dinamiche quadrifasiche pesate in T1 dopo per fusione e.v. di m.d.c. paramagnetico.

L'utilizzo del m.d.c. permette di migliorare la valutazione dell'infiltrazione miometriale e cervicale con un elevato grado di accuratezza (186). L'accuratezza diminuisce quando la zona giunzionale dell'utero è difficilmente valutabile, come nelle donne in post menopausa; in presenza di una voluminosa massa endometriale che comprime il miometrio ed in presenza di plurimi o voluminosi fibromi; in donne con adenomiosi; quando il tumore si trova nel corno dell'utero dove il miometrio è fisiologicamente sottile. Tuttavia la RM con m.d.c. permette di valutare contemporaneamente tutte le strutture di interesse per il trattamento e la prognosi delle pazienti con Ca dell'endometrio meglio di tutte le altre metodiche non invasive (ecografia endovaginale e TC). I valori di accuratezza della RM nella stadiazione del Ca dell'endometrio, riportati da numerosi studi, variano da 83% a 92% con una sensibilità del 91 ed una specificità del 100%.

Gli elementi da ricercare e repertare nell'esame sono le dimensioni della neoplasia, l'eventuale interessamento del canale, il grado di infiltrazione del miometrio ( $<$  o  $>$  del 50%) l'eventuale estensione al di fuori del corpo uterino (parametri vescica retto peritoneo), eventuali adenopatie pelviche e lombo-aortiche (187).

Allo stato attuale la TC mantiene un ruolo nella stadiazione del carcinoma dell'endometrio solo per quanto riguarda la ricerca di metastasi polmonari ed epatiche, impianti peritoneali ed ingrandimenti linfonodali (oltre 1 cm nell'asse corto) (188).

### ***Diagnostica di laboratorio***

Nella pratica clinica non vi sono marcatori tumorali specifici che consentono una diagnosi precoce. I livelli di CA125 sierico sembrano essere significativamente elevati in pazienti con linfonodi positivi o infiltrazione miometriale profonda. Nel follow -up un aumento di tale marcatore potrebbe essere indice di ripresa di malattia in particolare negli istotipi siero- papilliferi. Tuttavia livelli elevati di CA125 possono riscontrarsi anche in pazienti sottoposte a radioterapia senza presenza di recidive (169).

*Accuratezza diagnostica di ecografia transvaginale, risonanza magnetica  
ed isteroscopia nella valutazione dell'invasione del canale cervicale  
in pazienti affette da tumore dell'endometrio.*

Appare evidente come negli ultimi anni si è andato sempre più accrescendo l'interesse per la personalizzazione del trattamento chirurgico al fine di garantire una buona qualità di vita alle pazienti.

In tale ottica è ancora controverso il trattamento del carcinoma endometriale allo stadio I. Invece, è unanime il consenso circa l'opportunità del ricorso alla chirurgia radicale nel management del carcinoma endometriale con estensione macroscopica alla cervice (stadio II sec FIGO), la cui storia naturale è assimilabile a quella del carcinoma primitivo della cervice. L'asportazione del tessuto connettivale paracervicale sembra garantire un margine più adeguato di tessuto libero da malattia, consentendo un più efficace controllo loco-regionale della malattia e quindi un miglioramento della sopravvivenza. Inoltre, la linfadenectomia sistematica pelvica e lomboaortica rappresenta un momento fondamentale dell'intervento chirurgico, in quanto, la letteratura riporta per lo stadio IIB una positività dei linfonodi regionali in percentuali variabili fra il 20 e il 30%.

È quasi superfluo ricordare che un intervento radicale di tipo II con linfadenectomia sistematica è gravato da un maggior numero di complicanze intra e post-operatorie, rispetto ad una semplice isterectomia extrafasciale, quali: lesioni vascolari, lesioni nervose, modificazione della funzione minzionale e della defecazione, formazione di tragitti fistolosi etc.

Quindi, la corretta individuazione del coinvolgimento del canale cervicale, in pazienti affette da carcinoma endometriale, consentirebbe una modulazione della radicalità chirurgica (in accordo alle linee guida FIGO) evitando così i rischi di un under o over-treatment con conseguente miglioramento del tasso di sopravvivenza e riduzione di inutili complicanze chirurgiche.

A tale scopo la FIGO nel 2006 ha stabilito che l'ecografia pelvica trans-vaginale e la Risonanza Magnetica con mezzo di contrasto sono le due tecniche necessarie per riconoscere l'invasione del canale cervicale in donne affette da carcinoma dell'endometrio. Tuttavia dai dati emersi dalla letteratura internazionale, negli ultimi anni, risulta evidente una estrema variabilità in termini di sensibilità e specificità di queste due tecniche. Pertanto noi proponiamo uno studio in cui queste tecniche vengono messe a confronto con isteroscopia che mostra un'accuratezza del 96% nella diagnosi dell'adenocarcinoma endometriale (178).

Obiettivo di questo studio è, infatti, confrontare in termini di sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e negativo, l'accuratezza di ecografia pelvica trans-vaginale, risonanza magnetica nucleare ed isteroscopia diagnostica nella valutazione preoperatoria dell'invasione del canale cervicale in pazienti affette da tumore endometriale. Al fine di poter: codificare un corretto staging preoperatorio per il cancro dell'endometrio; personalizzare il trattamento chirurgico; migliorare la sopravvivenza mediante un trattamento adeguato; ridurre i tassi di morbidità e mortalità legati alla radicalità chirurgica ed alle terapie adiuvanti.

A tale scopo, nel periodo compreso dal novembre 2006, presso il Dipartimento di Ginecologia, Ostetricia e Fisiopatologia della Riproduzione Umana dell'Università di



Napoli Federico II, sono state reclutate 159 pazienti con tumore dell'endometrio accertato istologicamente.

Tutte le pazienti sono state sottoposte ad ecografia transvaginale, risonanza magnetica addome-pelvi con mezzo di contrasto ed infine ad isteroscopia ambulatoriale con biopsia. L'isteroscopia è stata sempre eseguita come ultima tecnica per evitare che il passaggio dello strumento e/o le eventuali biopsie eseguite potessero alterare il quadro ecografico e le immagini radiologiche.

Inoltre, al fine di rendere i risultati omogenei ed attendibili, ogni metodica è stata eseguita sempre dallo stesso personale medico dedicato e con la stessa strumentazione.

L'ecografia transvaginale è stata effettuata con ecografo General Electric, Voluson E8.

L'isteroscopia è stata effettuata in ambiente ambulatoriale, con isteroscopio Bettocchi (Karl Storz, Tuttlingen, Germany) a flusso continuo del diametro di 5mm e dotato di ottica 30° e di canale operativo 5F. L'isteroscopia è stata eseguita mediante approccio vaginoscopico cioè senza l'ausilio dello speculum e della pinza da collo. Alle pazienti non è stata effettuata alcuna medicazione (anestesia, analgesia, sedazione). L'esame è stato sempre concluso con una biopsia endometriale mirata, effettuato con pinza Grasping.

La RMN è stata effettuata su addome e pelvi. L'esame su addome è stato eseguito con scansioni assiali FFE T1, TSE T2 e T2 SPIR; scansioni TSE T2 coronali. L'esame è stato completato con scansioni assiali FFE T1 proSet Bh prima e dopo infusione ev di mdc paramagnetico. L'esame su pelvi, con scansioni assiali TSE T1, T2 e T2 SPIR; scansioni coronali e sagittali TSE T2. L'esame è stato

completato con scansioni assiali e sagittali FFE T1 ProSet dopo infusione ev di mdc paramagnetico. L'utilizzo del m.d.c. permette di migliorare la valutazione dell'infiltrazione miometriale e cervicale con un elevato grado di accuratezza (187).

Tutte le pazienti sono state sottoposte ad intervento chirurgico di stadiazione, in accordo ai criteri stabiliti dalla FIGO, ed i dati derivanti dalle indagini diagnostiche pre-operatorie sono stati poi confrontati con l'esame istologico definitivo e sono stati estrapolati i dati di sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e negativo e di accuratezza diagnostica.

## Risultati

Sono state prese in esame 159 pazienti con diagnosi istologica di carcinoma endometriale le cui caratteristiche principali sono riportate nella tabella 21.

ETA' (media $\pm$ DS)	62.2
MENARCA (media $\pm$ DS)	12.0
MENOPAUSA (media $\pm$ DS)	47.6
NUMERO DI PARTI (media $\pm$ DS)	3.8
BMI (Kg/m <sup>2</sup> ) (media $\pm$ DS)	30.54
<i>FATTORI DI COMORBILITA'</i>	
DIABETE n(%)	36 (22.6%)
IPERTENSIONE n(%)	72 (45.2%)

**Tabella 21:** Caratteristiche principali delle pazienti arruolate

Centocinquantasei pazienti sono state sottoposte a trattamento chirurgico di stadiazione in accordo alle linee guida della FIGO, mentre per 2 paziente con diffusione vaginale della malattia (Stadio III) e 1 con diffusa carcinosi peritoneale (stadio IV) è stato emesso giudizio di inoperabilità.

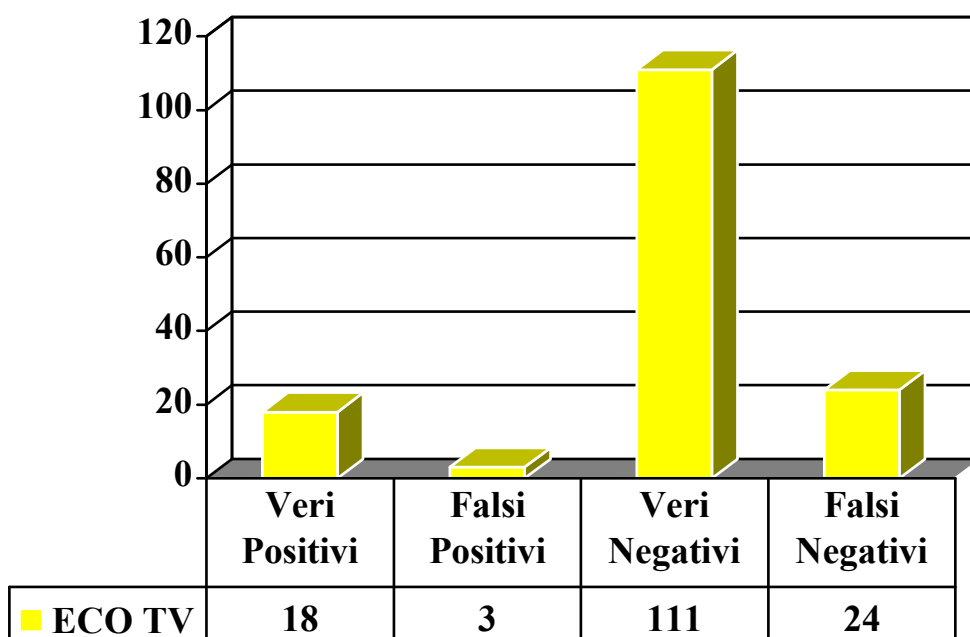
Centodue pazienti sono state sottoposte ad isterectomia radicale tipo I sec. Piver con annessectomia bilaterale, in 80 di questi casi è stata eseguita una linfadenectomia pelvica sistematica, nei rimanenti casi è stato praticato un sampling linfonodale. le altre 54 pazienti sono state sottoposte ad isterectomia radicale tipo II sec. Piver con annessectomia bilaterale e linfadenectomia pelvica e lombo-aortica sistematica.

All'analisi istologica definitiva del campione operatorio, 99 pazienti risultavano allo stadio I: 12 allo stadio IA, 60 allo stadio IB, 27 allo stadio IC; 42 allo stadio II: 24 allo stadio IIA, 18 allo stadio IIB; 15 allo stadio III: 6 allo stadio IIIA con citologia peritoneale positiva e 9 allo stadio IIIC con linfonodi pelvici positivi.

Tutte le pazienti sono state sottoposte a valutazione preoperatoria dell'invasione del canale cervicale mediante ecografia transvaginale, RMN e isteroscopia con biopsia.

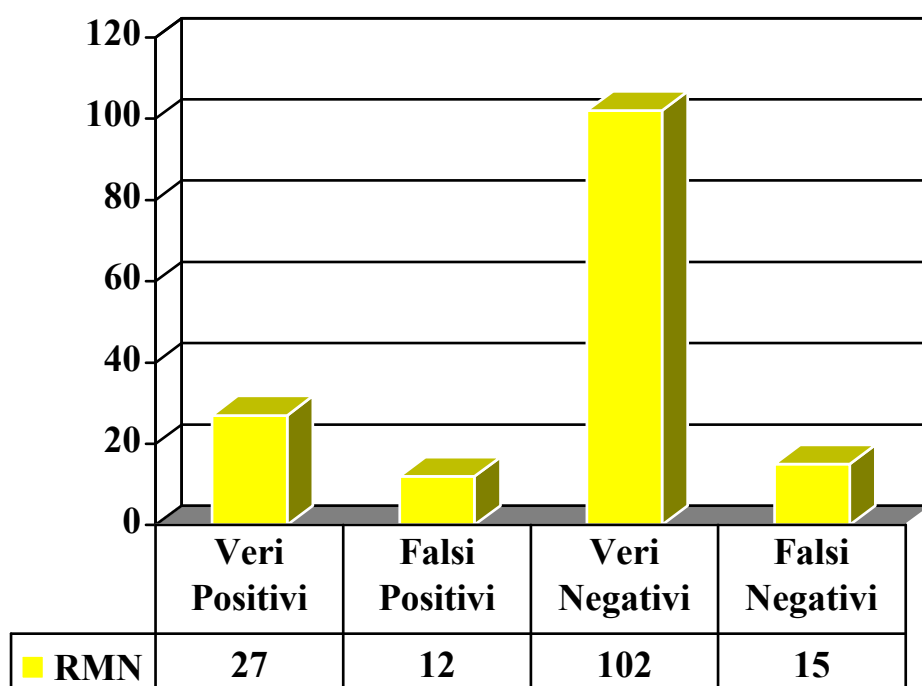
All'esame istologico definitivo, in 42 delle 156 pazienti è stata diagnosticata una invasione del canale cervicale, ma solo in 18 casi è stata fatta diagnosi preoperatoria mediante ECO-TV (fig.22).

**Figura 22:** Risultati dell'ecografia trans-vaginale



Al contrario di quanto ci saremo aspettati, anche la Risonanza Magnetica Nucleare addomino-pelvica con mezzo di contrasto, non è risultata impeccabile. Infatti, mediante questa indagine è stato possibile identificare solo 27 delle 42 invasioni del canale cervicale (fig.23).

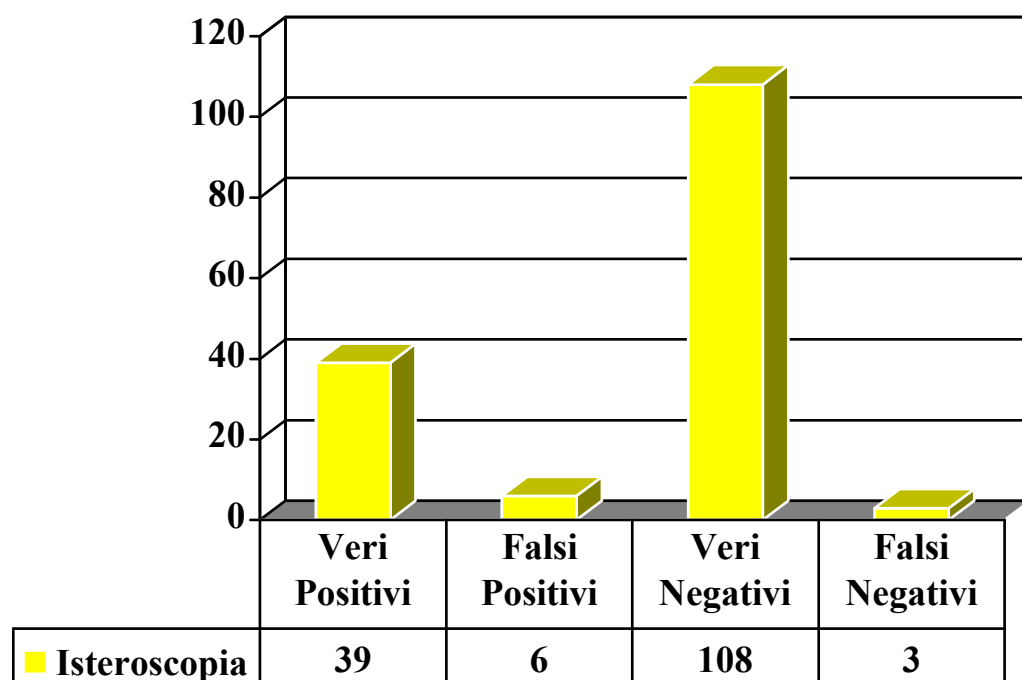
**Figura 23:** Risultati della Risonanza Magnetica Nucleare



Solo l'isteroscopia diagnostica ci ha permesso di riconoscere quasi tutte le invasioni del canale cervicale (fig.24).



**Figura 24:** Risultati dell'isteroscopia diagnostica



I dati sulla sensibilità e la specificità delle tre indagini diagnostiche (considerando come gold standard l'esame istologico definitivo) sono riportati nella tabella 22.

**Tabella 22** ; Sensibilità, Specificità, PPV, NPV di ecoTV vs. RMN vs. isteroscopia

	ECOTRANSVAGINALE	RMN	ISTEROSCOPIA
SENSIBILITA'	43%	64%	93%
SPECIFICITA'	97%	90%	95%
VPP	86%	69%	87%
VPN	82%	87%	97%

## **Discussione**

Dal 1971 al 1988 la stadiazione del carcinoma endometriale più accreditata è stata quella “clinica” formulata dalla FIGO. Nel 1988 è stata stabilita la necessità di una stadiazione “chirurgica” con l’introduzione di cinque elementi chiave: il grado istologico; l’infiltrazione miometriale (più o meno del 50%); la diffusione al canale cervicale (solo mucosa o anche stroma cervicale); la citologia peritoneale; la diffusione linfonodale.

Tuttavia, da una corretta valutazione preoperatoria dipende la tipologia di intervento chirurgico associata o meno alla linfadenectomia.

La prognosi del carcinoma dell’endometrio è direttamente correlata alla presenza o assenza di fattori di rischio intrauterini e/o extrauterini.

Uno dei principali fattori prognostici è rappresentato dalla invasione della canale cervicale; l’interessamento della mucosa e/o stroma della cervice determina una maggiore incidenza di metastasi linfonodali del 10-35% (morrow.....) ed una riduzione della sopravvivenza globale.

Una corretta valutazione preoperatoria dell’invasione del canale cervicale si rende necessaria al fine di modulare la radicalità chirurgica dell’intervento. Infatti, le linee guida FIGO hanno decretato che per stadi superiori al primo (in cui la malattia è confinata al corpo dell’utero) il trattamento deve essere più radicale sui parametri e sulla vagina (Isterectomia radicale tipo II sec. Piver) in modo da consentire un più efficace controllo della malattia. Proprio l’interessamento dell’istmo e del canale cervicale determina questo passaggio dal I al II stadio con una sostanziale riduzione

della sopravvivenza e la necessità di una chirurgia più radicale gravata da maggiori effetti collaterali a breve ed a lungo termine.

Le indagini diagnostiche comunemente utilizzate per la valutazione preoperatoria dell'invasione cervicale del carcinoma endometriale sono l'ecografia transvaginale, la risonanza magnetica e l'isteroscopia (con eventuale biopsia mirata).

Numerosi studi in letteratura hanno analizzato l'accuratezza diagnostica della ecografia transvaginale nella valutazione preoperatoria della invasione del canale cervicale, riportando una sensibilità variabile dal 54 al 96% e una specificità tra l' 85 e il 95% (189-191).

Per quanto riguarda la Risonanza Magnetica è la metodica di scelta per la valutazione prechirurgica del carcinoma dell'endometrio per la sua intrinseca risoluzione di contrasto e la multiplanarietà, in quanto permette di valutare contemporaneamente la profondità dell'infiltrazione miometriale, l'eventuale estensione alla cervice uterina e la presenza di linfonodi ingranditi a livello pelvico e lombo-aortico (185,186). Il protocollo d'indagine maggiormente utilizzato include acquisizioni assiali pesate in T1 anche con soppressione del grasso; assiali, sagittali e coronali pesate in T2; ed acquisizioni dinamiche quadrfasiche pesate in T1 dopo per fusione e.v. di m.d.c. paramagnetico.

Una recente metanalisi ha analizzato la sensibilità della RMN nella valutazione pre-operatoria dell'invasione cervicale del carcinoma endometriale, riportando una sensibilità 72% e una specificità del 93.2% (192). Tuttavia tale accuratezza diminuisce in presenza di una voluminosa massa endometriale che protrude nel canale, in presenza di plurimi o voluminosi fibromi e in donne con adenomiosi. Infatti, come emerge dai dati presenti in letteratura, la RMN presenta una scarsa

capacità predittiva per valutare la sola invasione ghiandolare, mentre invece risulta essere più elevata per la valutazione dell'invasione stromale (193,194). Le principali condizioni che possono sovrastimare l'invasione del canale sono rappresentate da: metrorragia in atto, presenza di sinechie e grosse masse tumorali che comprimono il canale.

Dall'analisi della letteratura internazionale, emerge che l'isteroscopia per la sua capacità di esaminare la cavità uterina e il canale cervicale con minimo fastidio per la paziente è diventata una indagine diagnostica fondamentale per lo studio della patologia endometriale (181,182). Inoltre, risulta essere una tecnica diagnostica preoperatoria molto accurata anche per la valutazione dell'invasione del canale cervicale, con una sensibilità che varia tra il 64% e il 100% e una specificità tra 73% e il 90% (195). L'isteroscopia permette infatti la visione diretta del canale cervicale, evidenziando l'eventuale presenza di una superficie endocervicale irregolarmente erosa, di grossolane ondulazioni della mucosa endocervicale e/o di formazioni esofitiche del canale cervicale che presentano atipie vascolari, e di distinguere se il tumore endometriale ha invaso il canale cervicale, oppure se protrude in esso, senza interessarne la parete.

Un ulteriore vantaggio di tale tecnica consiste nella possibilità di effettuare, nella medesima seduta, biopsie mirate del canale, migliorando l'accuratezza diagnostica e riducendo la percentuale di falsi negativi e positivi.

Dal momento che in letteratura non esistono studi analoghi, il nostro gruppo si è preposto di confrontare la sensibilità e la specificità diagnostica delle tre indagini in 159 pazienti afferenti al nostro Dipartimento con diagnosi istologica di carcinoma endometriale.

Nel nostro studio l'ecografia transvaginale ha presentato una bassa sensibilità (43%) e VPN (82%), ma un'alta specificità (97%) e VPP (86%). Tale dati possono così essere spiegati: la capacità dell'eco TV di diagnosticare l'invasione cervicale è molto bassa, ma laddove il dato ecografico appare confermare una invasione cervicale, possiamo essere ragionevolmente sicuri che il dato istologico confermerà il dato ecografico.

La diagnosi ecografica di invasione del canale cervicale (177) è resa spesso difficoltosa dalla difficoltà a localizzare l'istmo uterino, che rappresenta il "punto di frontiera" tra il corpo uterino e la cervice. Ecograficamente l'istmo uterino può essere individuato dai seguenti punti di repere: mucosa del canale (che in post-menopausa non è purtroppo molto ben rappresentata), dall'angolo di versione (non sempre è ben definibile, talvolta per fissità del viscere o per esiti aderenziali) e dalla riflessione della vescica a livello della plica peritoneale vescico-uterina, normalmente lassa e quindi dissociabile dall'utero e dalla vescica (ma aderente per esiti di pregressi tagli cesarei). Recentemente, tuttavia, l'introduzione di apparecchiature ultrasonografiche capaci di eseguire manipolazione spaziale dell'immagine, la visualizzazione di immagini su piani di sezione "impossibili" da ottenere con le apparecchiature tradizionali, la ricostruzione elettronica tridimensionale del viscere e la visualizzazione tridimensionale dell'albero vascolare hanno impresso un notevole stimolo alla ricerca da parte dei ginecologi oncologi ecografisti, allo scopo di identificare ulteriori parametri.

La RMN ha presentato specificità, sensibilità e VPN sostanzialmente comparabili all'ecografia TV. Tuttavia il VPP della RMN (69%) è risultato essere inferiore al



rispettivo VPP dell'ecografia e dell'isteroscopia. Infatti, in accordo con i dati riportati in letteratura, la RMN presenta un elevato tasso di FP. Questi ultimi possono essere conseguenza di tumori endometriali del segmento inferiore del corpo dell'utero che protrudono nel canale e possono essere considerati come invasione del canale o artefatti dovuti a pretrattamenti come dilatazione e curettage.

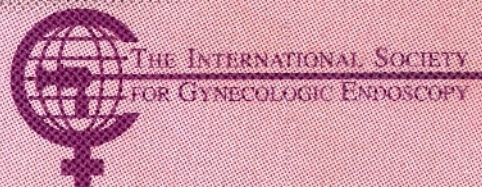
In accordo con la letteratura internazionale, anche nel nostro studio la Risonanza Magnetica si dimostrata altamente sensibile nel riconoscere le invasioni stromali profonde del canale (stadio FIGO II B) rispetto alla sola invasione ghiandolare (stadio FIGO II A).

I risultati di questo studio hanno sostanzialmente confermato che l'isteroscopia presenta la più elevata sensibilità e specificità diagnostica con valori rispettivamente dell'93 e dell'95%. I valori predittivi positivi e negativi sono risultati rispettivamente del 87 e 97%. Questo perché i falsi negativi sono pochi, per cui si dimostra una tecnica assolutamente affidabile anche nell'escludere l'interessamento cervicale. L'isteroscopia, infatti, essendo una tecnica a visione diretta evidenzia con chiarezza tutte le irregolarità della superficie cervicale quali erosioni, atipie vascolari, formazioni esofitiche e permette di distinguere se il tumore endometriale ha invaso il canale cervicale o se, semplicemente, protrude in esso senza interessarne la parete.

Le principali condizioni che possono alterare l'affidabilità di tale metodica sono principalmente abbondanti perdite ematiche e severe sindromi aderenziali.

Tuttavia, tale tecnica presenta l'enorme vantaggio di poter effettuare delle biopsie mirate che aiutano lo specialista a limitare, ed il più delle volte, a dirimere i dubbi interpretativi riducendo significativamente il tasso di falsi positivi e negativi.





17<sup>th</sup> Annual Congress of the International  
Society for Gynecologic Endoscopy

# Women's Health from Diagnosis to Treatment

WORLD CONGRESS OF  
GYNECOLOGIC ENDOSCOPY

SEGI ANNUAL CONGRESS

Bari - Italy - June, 4-7 2008  
Sheraton Nicolaus Hotel





17<sup>th</sup> Annual Congress of the International  
Society for Gynecologic Endoscopy

# Women's Health from Diagnosis to Treatment

WORLD CONGRESS OF  
GYNECOLOGIC ENDOSCOPY

## SEGi

Società Italiana di Endoscopia Ginecologica

### ANNUAL CONGRESS

Bari - Italy - June, 4-7 2008  
Sheraton Nicolaus Hotel



## **Evaluation of cervical involvement in endometrial carcinoma: a comparison between three different techniques**

*Giuseppe Bifulco, Attilio Di Spiezio Sardo, Carmela Coppola, Giada Lavitola, Maurizio Guida, Filomena Sorrentino, Marianna Scognamiglio, Carmine Nappi*

*Department of Gynaecology and Obstetrics, and Pathophysiology of Human Reproduction, University of Naples "Federico II", Italy*

**Study Objective:** To determine the diagnostic accuracy of transvaginal ultrasonography, hysteroscopy and magnetic resonance imaging in detecting cervical involvement in endometrial cancer. **Design:** Retrospective-study. **Setting:** Department of Gynaecology and Obstetrics and Pathophysiology of Human Reproduction of the University of Naples "Federico II".

**Patient(s):** Fifty-three patients with histological diagnosis of endometrial carcinoma.

**Intervention(s):** All patients underwent preoperative evaluation of cervical invasion by transvaginal ultrasound, hysteroscopy (performed using a 4mm continuous flow office hysteroscope with a 30° grade optic and an incorporate 5 Fr working channel for eventual biopsy) and MRI. Fifty-two patients were scheduled for a radical hysterectomy, while one patients was inoperable.

**Measurements and Main Results:** Data regarding sensitivity, specificity, as well as positive and negative predictive value of the three diagnostic methods were compared considering the final pathological evaluation as gold standard. Cervical involvement evaluated by hysteroscopy demonstrated a sensitivity of 86% and specificity of 89.4% with positive predictive value (PPV) of 75% and a negative predictive value (NPV) of 94%. Transvaginal ultrasound showed a low sensitivity (14%) and NPV (76%) but a high specificity (100%) and PPV (100%).

Our data show that specificity, sensitivity and NPV of MRI in detecting cervical involvement. are comparable to transvaginal sonography. However, PPV(67%) of MRI was inferior to those of TV-ultrasound and hysteroscopy.

**Conclusions:** Office hysteroscopy is a safe and effective method for the evaluation of cervical involvement in women affected by endometrial carcinoma. The chance to perform a target biopsy during the same examination increases the diagnostic accuracy of hysteroscopy.

## **Il canale cervicale nelle lesioni squamose della cervice uterina**

Per esprimere in maniera chiara il coinvolgimento dell'endocervice da parte delle lesioni squamose cervicali è fondamentale definire il concetto della "ultima ghiandola". Questa entità anatomica è stata introdotta da Hamperl e coll. (196) durante gli studi sui cambiamenti epiteliali. Essi notarono che la mucosa endocervicale spesso si estendeva sulla esocervice (ectopia) durante la vita riproduttiva, mentre si retraeva nel canale nelle donne in epoca menopausale. L'estensione distale dell'ectopia è, appunto, delimitata dall'ultima ghiandola che rappresenta altresì il punto focale per la distribuzione del tessuto connettivo stromale e dei vasi sanguigni alla zona esterna della cervice uterina. Tali strutture accompagnano ogni cambiamento di sede dell'ultima ghiandola e rappresentano degli indicatori permanenti della sua posizione dalla vita intrauterina fino al periodo post-menopausale.

Il significato dell'ultima ghiandola, quindi, è da attribuire al fatto che essa conserva la sua posizione in maniera costante e costituisce un importante riferimento biologico che separa prossimamente la mucosa endocervicale (epitelio colonnare) e distalmente l'epitelio squamoso originale.

Idealmente tale giunzione squamo-colonnare si dispone a livello dell'orifizio esterno; quando invece appare dislocata ad una certa distanza al di fuori dell'orifizio esterno si realizza il quadro della ectopia. L'epitelio colonnare della ectopia risulta spesso sostituito da epitelio squamoso metaplasico che è in continuità, spesso in modo indistinguibile, con l'epitelio squamoso originale. In tali circostanze, la



giunzione squamo-colonnare viene pertanto spostata prossimamente ad una certa distanza dall'ultima ghiandola, determinando ciò che Pixley ha definito la nuova giunzione squamo-colonnare (197).

Quando questa nuova giunzione si localizza in alto nel canale cervicale, è possibile che tutte quelle lesioni proprie dell'esocervice, sia benigne quali lesioni condilomatose, che displastiche quali CINI, CIN II e CIN III, nonché neoplastiche, possono coinvolgere il canale cervicale.

Tali lesioni, si svilupperanno nel contesto di quella che è stata definita la "terza mucosa": epitelio squamoso che si mescola con lo strato ghiandolare ricoprendolo, che corrisponde alla zona di trasformazione della colposcopia. Essa, quindi, è localizzata tra la nuova giunzione squamo-colonnare e l'ultima ghiandola (giunzione squamo-colonnare originale).

Di conseguenza ogni tipo di epitelio squamoso, normale o patologico, prossimale all'ultima ghiandola, deve svilupparsi attraverso la via della metaplasia squamosa. Tale processo comincia con la comparsa di una fila di cellule subcolonnari di riserva. Tali cellule sono distribuite sotto l'epitelio colonnare in zone ben definite. L'epitelio squamoso che deriva dalla moltiplicazione di queste cellule, probabilmente, solleva il preesistente epitelio colonnare sostituendolo e gradualmente raggiunge una completa maturazione.

Numerose aree di cellule subcolonnari possono svilupparsi contemporaneamente ed essere isolate o adiacenti tra loro. Sin dall'inizio del processo metaplasico possono manifestarsi delle atipie. È impossibile predire quali casi di metaplasma atipica svilupperanno pienamente una CIN; ma quando questa origina nella porzione prossimale della zona ghiandolare, ciò avviene sempre attraverso una metaplasma

squamosa atipica. Inoltre, il grado di displasia che può derivarne, può variare da zona a zona delle varie aree metaplasiche. Questo processo può giustificare il riscontro, seppur raro, di salti di lesione (zone atipiche, anche di diverso grado, separate da tessuto colonnare sano) nel contesto del canale cervicale.

Ma che cosa scatena la metaplasma squamosa? La metamorfosi dell'epitelio colonnare nella ectopia può essere legata al diverso ambiente ed al pH acido della vagina. Questa teoria, tuttavia, non giustifica il motivo per il quale la metaplasia squamosa possa svilupparsi nell'ambiente alcalino della zona superiore del canale endocervicale come pure nelle zone profonde delle ghiandole cervicali. Anche i fattori ormonali durante il periodo fetale, la gravidanza e la menopausa possono influenzare lo sviluppo della metaplasma squamosa; gli estrogeni esogeni, per esempio, possono indurre la metaplasia negli animali da esperimento (196).

Studi condotti su sezioni seriate di campioni di conizzazione evidenziano che più la localizzazione dell'epitelio atipico risulta distale, oltre l'ultima ghiandola sulla esocervice, maggiore è la sua differenziazione. Il carcinoma in situ indifferenziato è localizzato esclusivamente nell'area ghiandolare, è spesso situato in alto nel canale cervicale, dove la SIL non viene mai rilevata. Pertanto il carcinoma in situ è situato, di regola, prossimamente alla SIL (198,199). Il carcinoma in situ moderatamente differenziato e la displasia moderata raramente vengono rilevati distalmente rispetto all'ultima ghiandola, nell'epitelio squamoso originale, dove invece è più frequente riscontrare la presenza di displasia lieve e di carcinoma in situ ben differenziato.

Le forme scarsamente differenziate di carcinoma in situ (CIN III) possono coinvolgere non solo la superficie ma anche le ghiandole endocervicali, sia che facciano parte di una ectopia o che siano localizzate nel canale endocervicale. Nelle

sezioni istologiche la distinzione tra coinvolgimento ghiandolare, in cui la neoplasia è ancora intraepiteliale (le ghiandole endocervicali sono semplici invaginazioni dell'epitelio colonnare di superficie), ed invasione non è sempre agevole ma è molto critica in quanto implica delle decisioni fondamentali per il tipo di trattamento.

## **CAPITOLO 3: tecniche diagnostiche per lo studio della cervice uterina**

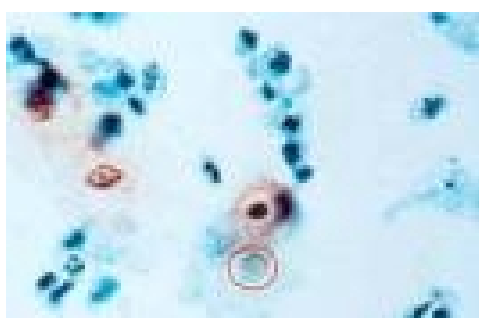
### **Tecniche tradizionali: indicazioni e limiti**

*Il pap-test* è il test di screening volto ad identificare le lesioni preneoplastiche dell'eso e dell'endocervice. L'affidabilità di tale screening è legata all'accuratezza del prelievo. È, infatti, necessario un campione cellulare rappresentativo da sottoporre all'esame citologico. Più precisamente, il pap-test deve contenere cellule provenienti dall'esocervice, dall'endocervice e dalla zona di trasformazione. In quest'ultima zona, appunto, si sviluppano le lesioni squamose intraepiteliali (SIL), ovvero le lesioni preneoplastiche dell'esocervice, e le lesioni ghiandolari (AGC). Non è sempre agevole identificare tale zona di trasformazione, in quanto la sua localizzazione cambia nel corso della vita, a seconda dell'età e delle varie fasi della vita riproduttiva. Infatti il prelievo potrà risultare inadeguato soprattutto in peri e post- menopausa, quando la giunzione squamo-colonnare (GSC) è fisiologicamente risalita nel canale cervicale o vi è stenosi dell'orificio uterino esterno. Questo ed altri fattori, come scarsità del materiale, spiccata flogosi, eritrociti che oscurano il materiale cellulare, errori di allestimento del vetrino, possono essere alla base di risultati falsamente negativi al pap-test.

Come suggerito da una ampia revisione della letteratura, la percentuale di falsi negativi riscontrabili al pap test è molto variabile (dal 2 al 65% circa) ed è correlata, in particolare, alla ridotta sensibilità del test nel riconoscimento di lesioni di basso grado (CIN I e CIN II) e di quelle associate ad infezione da HPV (65-67).

Questo problema è stato in parte risolto con l'adozione della nuova classificazione citologica secondo Bethesda che mira ad escludere i falsi negativi da prelievo inidoneo o da non corretto allestimento del preparato.

Recentemente, inoltre, l'utilizzo della citologia su strato sottile (fig.25) ha ulteriormente contribuito a facilitare l'individuazione di lesioni preneoplastiche rispetto allo striscio convenzionale ed ha ridotto ulteriormente l'incidenza di falsi negativi. La metodica in strato sottile, consente infatti una migliore fissazione, una più facile visualizzazione delle cellule senza sovrapposizione cellulare ed una migliore lettura per la riduzione degli elementi infiammatori ed ematici. Tuttavia, anche questa nuova tecnica presenta molti limiti legati soprattutto al minor quantitativo di materiale diagnostico, alla maggiore dispersione di cellule anormali (non più circoscritte a zone precise del vetrino), all'individuazione meno frequente delle cellule endocervicali ed al costo elevato (23). Va comunque rammentato che la correlazione tra diagnosi citologica e istologica è imperfetta, e che pertanto il pap-test rappresenta un metodo di screening e non un metodo diagnostico, la cui positività comporta la necessità di procedere ad approfondimenti diagnostici.



**Figura 25:** Citologia su strato sottile





*La colposcopia* nell'ambito degli screening organizzati, la colposcopia è necessaria come esame di II livello. Il concetto è stato bene espresso dalla Task Force Canadese (2° Rapporto Walton del 1982): “La citologia evidenzia la neoplasia preclinica e clinica cervicale. La colposcopia valuta la cervice uterina con citologia anormale e permette la localizzazione della zona della portio ove eseguire la biopsia per l'esame istologico. La colposcopia non deve essere considerata una tecnica di screening, ma un importante ausilio per la localizzazione e la delimitazione dei precursori e del cancro già invasivo e microinvasivo della cervice uterina nelle donne con esame citologico cervico-vaginale anormale” (200).

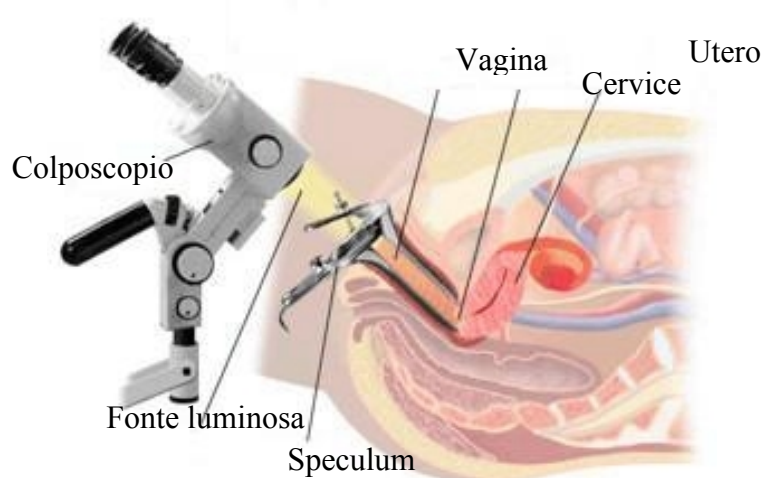
In presenza, quindi, di uno striscio anormale, prima di adottare una terapia, è necessaria la localizzazione della lesione da cui provengono le cellule anormali, la valutazione della estensione della lesione e la diagnosi istopatologica sulla base di biopsie mirate eseguite sotto guida colposcopica in uno o più settori. Una biopsia cervicale effettuata senza guida colposcopica, in assenza di una lesione visibile, comporta il rischio di una diagnosi istologica falsamente negativa in oltre il 20% dei casi.

La colposcopia permette di localizzare la lesione a livello cervicale e/o vaginale, o di escluderne l'esistenza, indirizzando quindi il prelievo bioptico in altri settori (endocervice, endometrio) (fig.26). Inoltre, permette spesso di differenziare, anche per il tramite di uno o più prelievi bioptici mirati, una lesione ancora circoscritta da una lesione invasiva, ed il riconoscimento di una lesione benigna o infiammatoria. L'accuratezza diagnostica della combinazione colpocitologia-colposcopia è risultata, fin dagli anni '60, assai vicina al 100% (201).



**Figura 26:** Localizzazione colposcopica della lesione e pinza da biopsia

La colposcopia (fig.27), utilizzando una specifica strumentazione (colposcopio, fonte luminosa, acido acetico) evidenzia alterazioni della superficie, dello spessore e composizione dell'epitelio e della vascolarizzazione del connettivo, che si traducono in immagini acetoreattive, iodonegative, a bordi netti o sfumati, isolate o associate, come epitelio irregolare, puntato, mosaico, sbocchi ispessiti, vasi atipici ecc.



**Figura 271:** Esame colposcopico

La classificazione colposcopica internazionale, approvata a Roma nel 1990 al 7° Congresso Mondiale di Patologia Cervicale e Colposcopia della International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy (202), ha introdotto la definizione di “trasformazione anormale”. Infatti, sulla base delle caratteristiche morfologiche delle immagini colposcopiche, è possibile distinguere due diversi gradi di anormalità: un Grado 1 e un Grado 2, evocanti substrati istologici a diversa gravità. La suddivisione della Trasformazione Anormale in 2 gradi (TA 1- Trasformazione Anormale grado 1 e TA 2- Trasformazione Anormale di grado 2), consente, inoltre, di stabilire iter e provvedimenti per la corretta gestione delle pazienti. La classificazione attualmente in uso è quella redatta dall’IFCPC (International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy) (203) presentata al congresso mondiale tenutosi a Barcellona nel 2002 che ha sostituito, apportando piccole modifiche, la classificazione del 1990.

<p align="center"><b>REPERTI COLPOSCOPICI NORMALI</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Epitelio pavimentoso originario</li> <li>- Epitelio cilindrico</li> <li>- Zona di trasformazione normale</li> </ul>
<p align="center"><b>REPERTI COLPOSCOPICI ANORMALI</b></p> <p><b>Trasformazione anormale grado 1 (TA-G1)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- epitelio aceto-bianco sottile piatto</li> <li>- mosaico regolare</li> <li>- puntato regolare</li> <li>- area parzialmente iodocaptante</li> </ul> <p><b>trasformazione anormale grado 2 (TA-G2)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- epitelio aceto-bianco ispessito</li> <li>- mosaico irregolare</li> <li>- puntato irregolare</li> <li>- area iodonegativa</li> <li>- vasi atipici</li> </ul>
<p align="center"><b>QUADRO COLPOSCOPICO SUGGERITIVO PER CARCINOMA INVASIVO</b></p> <p align="center"><b>COLPOSCOPIA INSODDISFACENTE</b></p>

Classificazione Colposcopica Internazionale IFCPC 2002



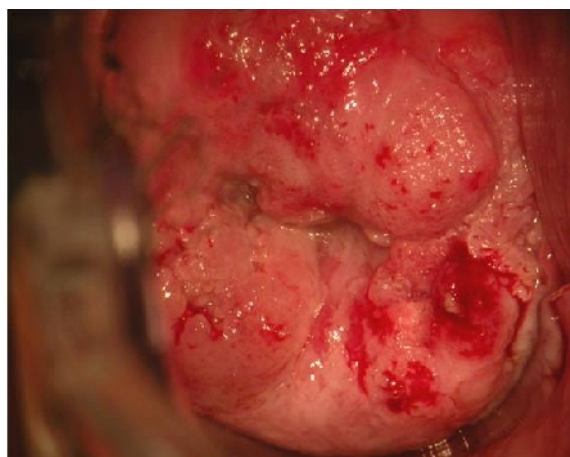
**Figura 28:** Colposcopia normale



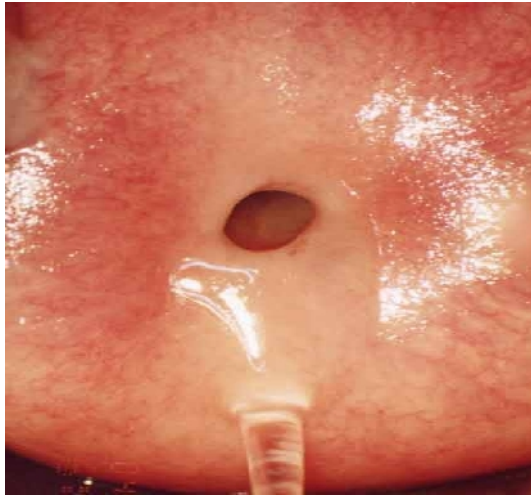
**Figura 229: ZTA G1**



**Figura 30: ZTA G2**



**Figura 31: Sospetto carcinoma invasivo**



**Figura 32:** Colposcopia insoddisfacente

La colposcopia presenta tuttavia delle limitazioni diagnostiche. Presenta, infatti, una scarsa sensibilità per la diagnostica delle lesioni ghiandolari anche quando queste sono localizzate in aree visibili con il colposcopio. Infatti, la presenza di una displasia ghiandolare o di un AIS può essere solo suggerita da reperti comunque aspecifici quali il disordine strutturale delle papille endocervicali, che possono essere ipertrofiche, ramificate, fragili e facilmente sanguinanti. Solo in caso di adenocarcinoma invasivo la colposcopia può essere suggestiva, anche se non specifica, di quadri diversi che vanno da aree cerebroidi che protrudono dal canale, aree ulcerate, erosioni, proliferazioni acetobianche sanguinanti, spesso associate in periferia ai quadri colposcopici (ANTZ G1 e G2) delle lesioni intraepiteliali squamose eventualmente concomitanti (137).

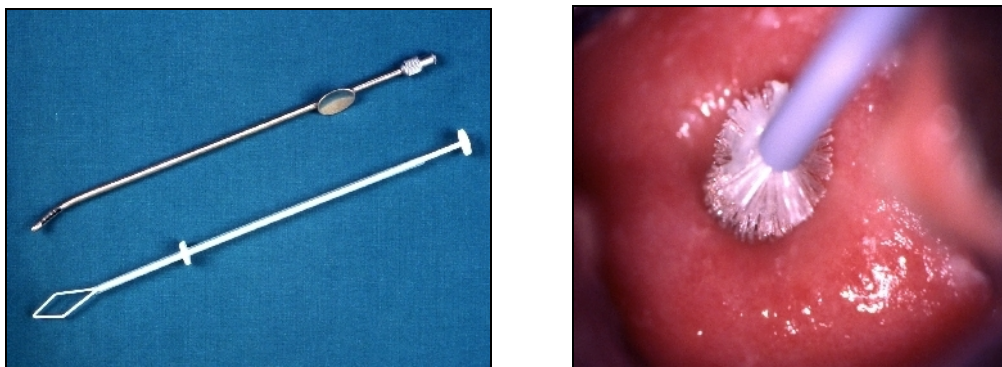
La principale limitazione è costituita dalla impossibilità di valutare il canale cervicale. Risulterà pertanto inconclusiva ed insufficiente quando la lesione esocervicale risale nel canale cervicale, o quando la giunzione squamo-colonnare non è visibile, ed inadeguata se la lesione è in sede esclusivamente endocervicale. Nelle



donne in età fertile e in premenopausa il problema non è in realtà molto frequente dato che la giunzione squamo-colonnare risulta visibile nell'80-90% dei casi. Dopo la menopausa, invece, dato che la giunzione squamo-colonnare risale verso l'interno, il valore della colposcopia diminuisce. Pertanto, in queste pazienti ed in tutte le pazienti con pap-test anormale in cui non è visibile la giunzione squamo-colonnare, si rende necessaria l'integrazione diagnostica con accurato studio del canale cervicale.

Il canale cervicale può essere studiato con metodiche cieche quali citologia endocervicale con cytobrush e curettage del canale cervicale (ECC) o con metodiche che cercano di individuare topograficamente l'eventuale lesione come la microcolpoisteroscopia, l'ecografia, l'endocervicoscopia; o ancora con l'escissione cilindrica diagnostica (chirurgica, laser o con ago a radiofrequenza) del tessuto circostante il canale cervicale. Tutte queste metodiche, tranne ovviamente l'ultima, presentano comunque dei limiti diagnostici già nella ricerca delle lesioni endocervicali squamose e tali limiti risultano ancora più importanti nella ricerca delle lesioni ghiandolari.

***Pap Test e Curettage Endocervicale*** Tra le metodiche cieche la citologia endocervicale mediante cytobrush sembrerebbe più affidabile dell'ECC (fig.33). Il curettage, infatti, spesso non è rappresentativo dell'intera mucosa endocervicale asportandone solo una parte e nel 12% dei casi non risulta adeguato per scarsità del materiale, mentre il brush sfiora il 100% di adeguatezza (204), anche se recenti studi sostengono che l'ECC resta la metodica di scelta per lo studio del canale cervicale (205).



**Figura 33:** Curettes e Citologia endocervicale

Infatti, già negli anni 80 veniva segnalata la possibilità che anche di fronte ad un esame colposcopico definito come soddisfacente e negativo per patologia, vi era la possibilità di rilevare con l'ECC una displasia del canale cervicale (206,207) e, per tali motivi, anche in studi molto recenti lo si considera un utile esame complementare (208). A conforto di tale tesi, vi sono molti studi che sostengono che l'ECC può avere un impatto notevole sulla diagnosi condizionando il susseguente atteggiamento terapeutico. Tale circostanza si verifica in una percentuale significativa di pazienti sottoposte a colposcopia per citologia anormale e/o SIL di alto o basso grado, e andrebbe valutata, pertanto, in questi casi, la sua utilità in associazione ad un esame colposcopico di routine (209).

Nello studio di Mogensen la colposcopia più la citologia endocervicale aveva una sensibilità del 96% mentre la colposcopia più il curettage era dell'82%. La quantità di falsi positivi è però significativamente più bassa nel curettage endocervicale mentre nella citologia endocervicale vi è un tasso di falsi positivi del 63%. E' da tenere comunque in considerazione che la tecnica citologica presenta un più basso costo ed è associata ad un minore discomfort della paziente (204).

***La microcolpoisteroscopia*** a contatto, o microcolposcopia, viene normalmente

impiegata per ottenere una visione diretta “in vivo” della morfologia cellulare dell’esocollo, dell’endocollo e quindi della giunzione squamo-colonnare con l’intento di eseguire una diagnosi con criteri citopatologici. Per ottenere ciò, è indispensabile la preparazione della cervice con due coloranti vitali: l’inchiostro blu-Watermann ed il blu di metilene. Il colorante blu-Watermann colorerà l’epitelio squamoso ed il blu di metilene l’epitelio colonnare dell’endocervice. È una indagine che si esegue a diretto contatto dell’epitelio cervicale con una lente a forte ingrandimento (150x), al fine di individuare le cellule con le loro caratteristiche nucleari e, riconoscere così un epitelio displasico o sospetto neoplastico (210). Questa tecnica tuttavia, presenta limiti di sensibilità; è infatti in grado di identificare solo indirettamente lesioni degli strati non superficiali della mucosa o di quanto presente a livello degli sfondati pseudoghiandolari. Necessita, inoltre, di operatori esperti con conoscenze citopatologiche, che devono aver effettuato un buon training di lettura citologica al microscopio ottico e per tali motivi non è mai entrata nella normale routine ginecologica.

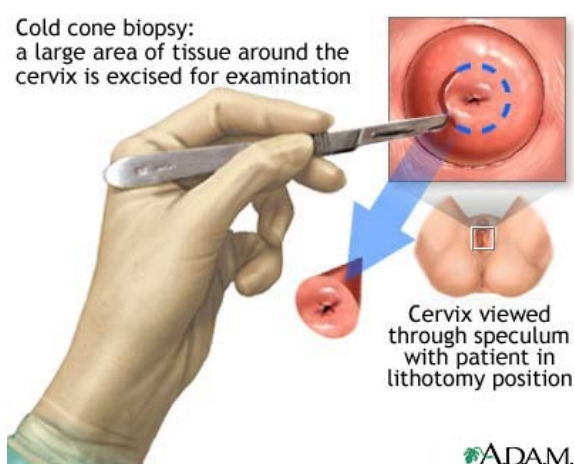
***L’ecografia trans-vaginale*** non mostra alcuna valenza preventiva nella diagnosi del cervicocarcinoma negli stadi precoci. I primi studi ecografici sulla patologia cervicale risalgono agli anni ’80, con sonda addominale, e successivamente con sonda transvaginale negli anni ’90, con risultati tutt’altro che incoraggianti riguardo alla sensibilità diagnostica della metodica per gli stadi iniziali di malattia. Scopo sostanziale della valutazione ecografica pre-chirurgica del cervicocarcinoma è la valutazione del volume tumorale e della sua estensione “locale”, fattori che fortemente influenzano la strategia terapeutica. Una corretta valutazione locale deve consentire di definire il volume del tumore, l’integrità dello stroma perilesionale, il

coinvolgimento parametricale e la diffusione agli organi vicini, inclusi i setti cervico-vescicale e cervico-rettale (177). Tale valutazione non è scevra di aspetti particolarmente lacunosi. Infatti, gli errori di stadiazione sono compresi tra il 28% (stadio Ib) ed il 60-64% (stadi IIa e IIb) (211) e sono sostanzialmente attribuibili ad una non corretta valutazione dell'infiltrazione dei parametri, ad una non corretta valutazione del setto retto-vaginale ed alla evenienza di un tumore a sviluppo endocervicale.

È ormai acclarato che il “gold standard” nella valutazione dell'estensione del tumore in fase pre-chirurgica sia rappresentata dalla Risonanza Magnetica Nucleare. Recentemente, tuttavia, l'introduzione di apparecchiature ultrasonografiche capaci di eseguire in tempi relativamente rapidi una acquisizione volumetrica di blocchi tissutali “tridimensionali” ha determinato un diverso approccio alla patologia uterina e cervicale, colmando in parte il gap tra l'ecografia transvaginale e la risonanza magnetica nucleare. La possibilità di memorizzazione di tali blocchi (voxel) ha inoltre consentito uno studio differito e “multi-operatore” dei casi clinici ed ha permesso un confronto meno impari con altre metodiche. La possibilità di manipolazione spaziale dell'immagine, la visualizzazione di immagini su piani di sezione “impossibili” da ottenere con le apparecchiature tradizionali, la ricostruzione elettronica tridimensionale del viscere e la visualizzazione tridimensionale dell'albero vascolare hanno impresso un notevole stimolo alla ricerca da parte dei ginecologi oncologi ecografisti, allo scopo di identificare ulteriori parametri.

***Il metodo escissionale***, chiamato anche frequentemente “conizzazione”, viene eseguito allo scopo di asportare un frammento conico o semisferico di cervice

uterina, con fini diagnostici e terapeutici, tenendo sempre in considerazione la forma della cervice e la distribuzione topografica delle varie anomalie epiteliali. Le indicazioni all'intervento sono: CIN III; CIN di vario grado con zona di trasformazione non completamente visibile (la lesione si approfonda nel canale cervicale); citologia ripetutamente positiva e colposcopia negativa, con curettage endocervicale (ECC) positivo o negativo; evidenza di possibile carcinoma invasivo su citologia o colposcopia o istologico in disaccordo tra loro; sospetto di adenocarcinoma in situ; microinvasione sulla biopsia mirata; paziente potenzialmente difficile al follow-up. Sono considerate tecniche chirurgiche escissionali quelle eseguite con ansa diatermica o ago a radiofrequenza, con lama fredda e con laser CO<sub>2</sub>. Ogniuna di queste tecniche può essere valida se rapportata all'esperienza dell'operatore (204).



**Figura 33:** Conizzazione con lama fredda

Un aspetto importante è rappresentato dalla valutazione dell'estensione della lesione displastica e dello stato dei margini di resezione chirurgica. Questi parametri sono importanti dal punto di vista prognostico in termini di probabilità di recidiva e

di persistenza di lesione (212). Infatti, l'interessamento del margine di resezione endocervicale, associato al grado della lesione displastica, rappresenta il fattore maggiormente predittivo di persistenza o di recidiva della lesione; tra gli altri fattori sono presi in considerazione anche l'entità dell'interessamento delle cripte ghiandolari e di più quadranti, l'età della paziente e la sede della giunzione squamocolumnare (213). Per una corretta valutazione di tali parametri è importante asportare un frammento di tessuto con danni termici contenuti. Per tale motivo la conizzazione effettuata tradizionalmente con lama fredda rappresenta per il patologo l'optimum perchè consente l'esecuzione di prelievi di discrete dimensioni, facilmente orientabili e senza alterazioni tissutali.

Oltre alla qualità del pezzo operatorio, anche le dimensioni sono cruciali. La conizzazione poco profonda può essere eseguita nei casi in cui la lesione è confinata colposcopicamente alla esocervice o alla parte inferiore del canale cervicale. Se la lesione si estende in alto, nel canale, al di fuori della visuale del colposcopio, dovrebbero essere escissi circa i 2/3 del canale cervicale. Quindi un cono può essere largo e poco profondo o stretto ed allungato, a seconda della sede e delle dimensioni della lesione (196).

Da queste precisazioni appare evidente che l'impiego del metodo ecissionale, come tecnica diagnostica, spesso comporta una eccessiva demolizione dei tessuti.

Appare evidente , pertanto, l'importanza di impiegare nuove metodiche strumentali che aiutino lo specialista a meglio definire la localizzazione, i limiti e le caratteristiche della lesione al fine di ottimizzare la valutazione prechirurgica e di modulare l'ampiezza (profondità) dell'escissione chirurgica.



## **Una nuova tecnica per lo studio del canale cervicale:**

### ***l'Endocervicoscopia, nostra esperienza***

Questa linea di ricerca è volta allo sviluppo ed alla valutazione di una nuova tecnica diagnostica per lo studio del canale cervicale in pazienti affette da patologie preneoplastiche della cervice uterina.

Questo studio nasce dalla constatazione che negli ultimi anni, l'esteso utilizzo della citologia cervico-vaginale, ha evidenziato una elevata incidenza di lesioni precancerose, ed anche francamente cancerose, a carico del collo dell'utero di soggetti appartenenti a fasce di età sempre più giovane. Ciò sarebbe da mettere in relazione alla maggiore permissività in campo sessuale (età più precoce del primo rapporto sessuale, maggior numero di partner, promiscuità sessuale) e conseguente maggiore diffusione dell'HPV (98).

Da ciò deriva la necessità di eseguire interventi ultra conservativi per cercare di preservare la fertilità nelle donne giovani affette da lesioni intraepiteliali della cervice. Inoltre, le più moderne tecniche diagnostico-terapeutiche hanno posto sempre più attenzione anche al mantenimento di una cervice che possa permettere un adeguato follow-up citologico e colposcopico: vanno quindi proscritti tutti gli interventi che possono portare alla risalita della giunzione squamo-colonnare in sede non esplorabile o che portino alla stenosi del canale cervicale, quali quelli che prevedono l'applicazione di punti alla Sturmdorff.

La letteratura moderna ha, tuttavia, evidenziato, in studi eseguiti su donne isterectomizzate, una persistenza di malattia, dopo il trattamento primario

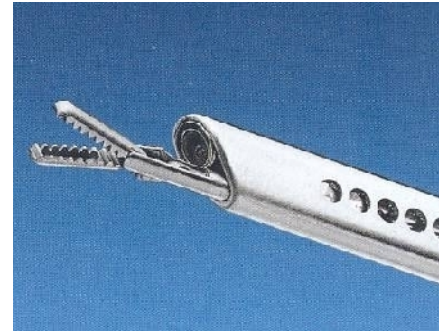
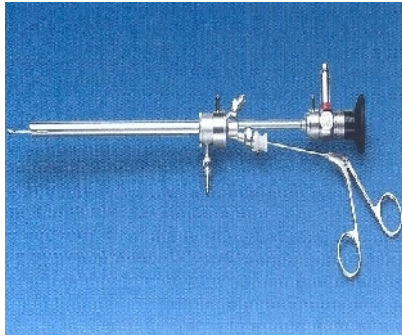
conservativo, variabile dal 16 al 34% (212,214-216). Questi dati sono, probabilmente espressione di tutte le lesioni che si sviluppano all'interno del canale cervicale e che, pertanto, non vengono adeguatamente indagate. Il canale cervicale, infatti, data la sua localizzazione, conformazione e, spesso, impenetrabilità, offre svariate difficoltà analitiche.

A tale scopo, proponiamo l'impiego di una nuova tecnica, per l'esplorazione del canale cervicale, che si propone di superare i limiti della colposcopia adoperando la strumentazione isteroscopica ed i principi e la classificazione colposcopica delle lesioni: l'endocervicoscopia.

### **la tecnica**

Per eseguire l'endocervicoscopia utilizziamo: un isteroscopio diagnostico dotato di ottica da 2.9 mm con visione foro-obliqua a 30° e camicia operativa a flusso continuo, di profilo ovalare, con diametro massimo di 4 mm (Karl Storz, Tuttlingen, Germany); una fonte luminosa; una telecamera digitale con monitor televisivo ad alta risoluzione ed eventualmente un sistema di video registrazione e ripresa fotografica.

Come mezzo di distensione adoperiamo la soluzione fisiologica (217) che, oltre ad ottenere una buona distensione, ci permette di ottimizzare la visione allontanando i muchi ed eventuale sangue, evento tutt'altro che infrequente e causa di notevole intralcio all'esame (fig.34,35).



**Figura 34:** isteroscopia diagnostica

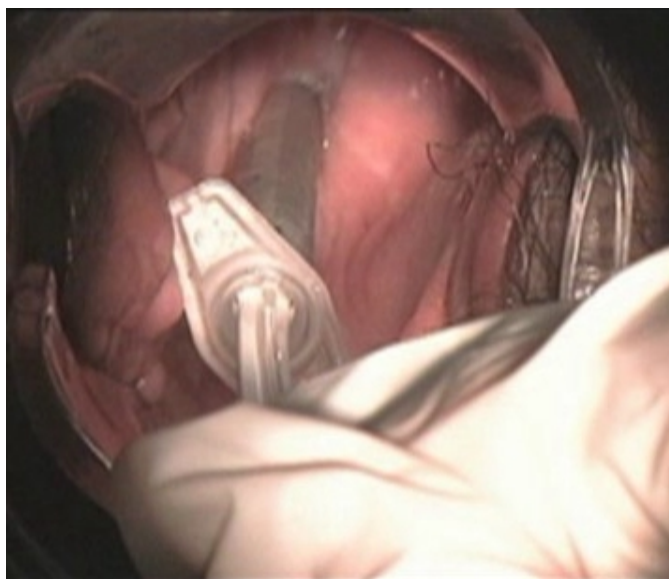


**Figura 35:** fonte luminosa; telecamera digitale con monitor televisivo ad alta risoluzione; sistema di videoregistrazione; pompa elettronica di aspirazione ed irrigazione (Endomat di Hamou); mezzo di distensione (soluzione fisiologica NaCl 0,9%); unità per elettrochirurgia (Versapoint)

Tutte le endocervicoscopie vengono eseguite con approccio vaginoscopico (218).

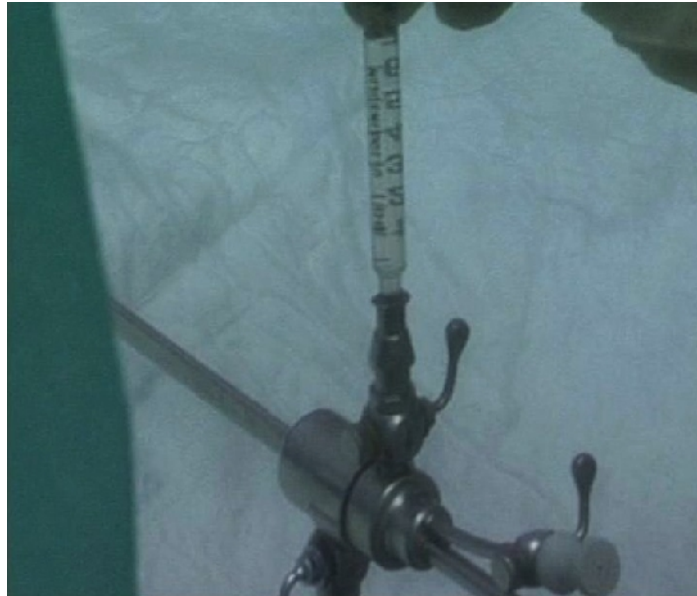
Prima di iniziare la valutazione, il tessuto da esaminare va preparato con acido acetico al 5%. A tal proposito è possibile impiegare due diversi approcci per l'applicazione del colorante vitale. Un approccio tradizionale(fig.36), da noi inizialmente adoperato, che comporta l'uso dello speculum e quindi l'acido acetico al 5% viene applicato sulla portio, utilizzando tamponi montati su pinze, e iniettato nell'endocervice, adoperando una siringa da insulina (1 ml) cui è stato tolto l'ago,

imprimendo solo una leggera pressione sullo stantuffo dopo che la porzione terminale della siringa è stata inserita nell' orificio uterino esterno (OUE).



**Figura 36:** Approccio tradizionale con speculum vaginale

Al termine di questa fase, viene rimosso lo speculum e la valutazione endoscopica avviene con approccio vaginoscopico. In alternativa, al fine di migliorare la compliance delle pazienti, è possibile iniziare l'esame direttamente con l'approccio vaginoscopico (fig.37) applicando l'acido acetico mediante lo stesso isteroscopio. Più precisamente, una volta visualizzata la portio con l'isteroscopio, in approccio vaginoscopico, posizioniamo lo strumento all'OUE e interrompiamo l'erogazione di soluzione fisiologica, a questo punto, rimuoviamo il collegamento dell'acqua in entrata ed iniettiamo 2 ml di soluzione di acido acetico al 5% attraverso il canale dell'inflow.



**Figura 37:** Approccio vaginoscopico con iniezione di acido acetico al 5% attraverso il canale di inflow

In questo modo anche l'applicazione del colorante vitale avviene sotto diretta visione endoscopica. Basta far trascorrere uno o due minuti, il tempo di ricostituire il collegamento con il mezzo di distensione, e poi riprendere l'erogazione della soluzione fisiologica.

Al fine di garantire una corretta e quanto più fedele valutazione della cervice e, soprattutto, dell'endocervice è fondamentale adoperare pressioni di erogazione del mezzo di distensione comprese tra 30 e 50 mmHg. Pressioni più elevate comporterebbero alterazioni della morfologia, colorazione e vascolarizzazione tessutale.

Inoltre, essendo il canale cervicale una cavità di piccolo calibro, è necessario ridurre al minimo l'intensità della fonte luminosa per evitare l'inconveniente della riflessione che potrebbe impedirci di riconoscere delle aree acetobianche.

L'esame inizia con la visualizzazione, in panoramica, della cervice e valutazione



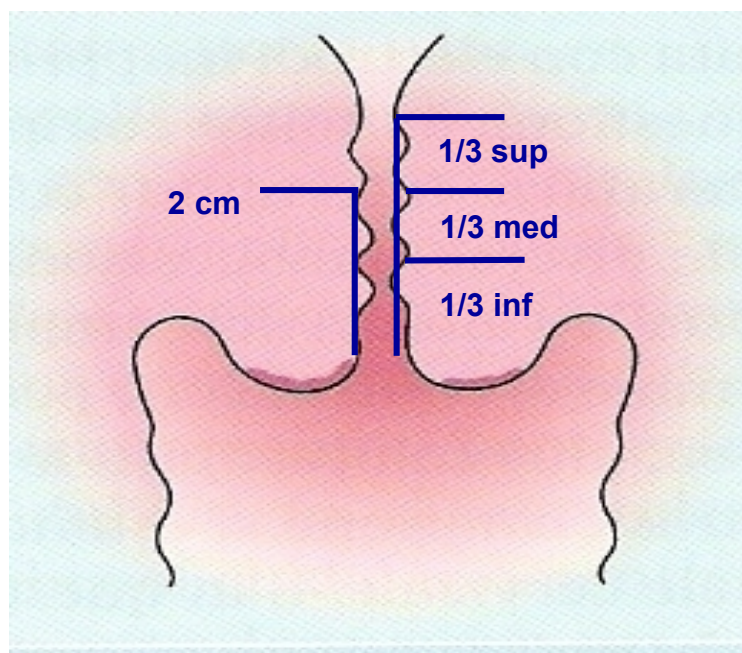
della zona di trasformazione con criteri di tipo colposcopico. Deve essere, quindi, visualizzata completamente la giunzione squamo colonnare (GSC), definita la sua sede ed il suo decorso. Devono essere valutate eventuali lesioni benigne come polipi e cisti di Naboth e aree di trasformazione normale, precisando la loro dislocazione nel canale cervicale. Deve essere valutato il trofismo, la vascolarizzazione e la morfologia della mucosa endocervicale, con particolare riferimento alle possibili variazioni in base all'epoca del ciclo e dell'età della paziente (219).

L'esame, infatti, presenta un certo grado di variabilità a seconda della fase pre o post ovulatoria del ciclo mestruale e, a seconda del periodo di vita della donna, ovvero, età fertile, peri o post menopausa. Nel caso si tratti di donna in età fertile è preferibile effettuare l'esame in fase preovulatoria, quando il muco cervicale è più scarso, poiché una sua eccessiva presenza disturberebbe l'esame. Le immagini sono abbastanza caratteristiche: si osservano le colonne mucose anteriori e posteriori, con il loro aspetto pseudopolipoide e le cripte ghiandolari disposte lateralmente. È tipico il disegno dell'Arbor Vitae che si prolunga in alto, verso l'orificio uterino interno (OUI). In fase post ovulatoria il muco è più abbondante, ma il canale si distende più facilmente e l'orificio uterino interno viene valicato con minore difficoltà. Nella premenopausa si verifica precocemente un'atrofia dell'Arbor Vitae fino alla scomparsa pressoché totale delle pliche mucose; le cripte ghiandolari appaiono assottigliate e fibrose. Il muco cervicale è scarso e lo spessore della mucosa è molto ridotto, per cui, a causa della maggiore trasparenza del tessuto fibroso sottostante, le superfici sono più riflettenti ed è più frequente un sanguinamento al passaggio dello strumento. È frequente, inoltre, in quest'epoca, una stenosi serrata dell'OUI che appare difficilmente valicabile. Va ricordato che l'età perimenopausale e

postmenopausale è quella più importante per l'esame del canale cervicale visto che la risalita fisiologica della GSC rende, il più delle volte l'indagine colposcopica insoddisfacente.

Infine, naturalmente, devono essere descritte le aree di trasformazione atipica, precisando la loro topografia nel canale cervicale in relazione alla GSC e all'OUE. In accordo con l'International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy le lesioni visualizzate vengono classificate sulla base dei caratteri delle diverse immagini e suddivise in lesioni di Grado 1 e Grado 2 (TAG1-TAG2), evocanti substrati istologici a diversa gravità (220).

Al fine di uniformare la terminologia descrittiva è conveniente suddividere idealmente il canale cervicale in 3 porzioni: 1/3 inferiore; 1/3 medio ed 1/3 superiore (fig.38).



**Figura 38:** Suddivisione schematica del canale cervicale

Il 1/3 superiore, presenta spesso un fisiologico restringimento e quindi può essere necessario, per superarlo, elevare la pressione di erogazione del mezzo di distensione, fino ad arrivare ai 60-70 mmHg necessari per una corretta valutazione della cavità uterina. Infatti, l'endocervicoscopia viene sempre completata con un esame isteroscopico.

Questa tecnica impone lo studio del canale cervicale in entrata al fine di evitare che il traumatismo dovuto al passaggio dello strumento possa essere causa di un mancato riconoscimento della lesione.

Per una corretta osservazione, la punta dell'endoscopio deve essere mantenuta ad una distanza di pochi millimetri dalla superficie del tessuto da esaminare ed avvicinandosi o allontanandosi da esso si può ottenere un maggiore o un minore ingrandimento. Il movimento di scorrimento longitudinale, in senso craniale, consente di osservare la cervice per tutta la sua lunghezza, mentre i movimenti rotatori dell'ottica permettono di osservare le pareti laterali, in modo da evidenziare eventuali lesioni. Una volta individuata la lesione, può essere studiata più dettagliatamente avvicinando la punta dell'ottica al tessuto, in modo da ottenere un ingrandimento dell'immagine tale da consentire uno studio nei minimi particolari del tessuto patologico.

Il tempo richiesto per l'esame varia a seconda dell'esperienza dell'operatore e delle condizioni anatomiche della cervice, ma è quasi sempre breve: la sua durata oscilla, in genere, tra i 2 ed i 7 minuti, cui va aggiunto il tempo necessario per effettuare l'isteroscopia.

Nel corso dell'esame è possibile praticare un prelievo bioptico mirato con pinze apposite molto sottili (5 Fr). In alternativa, quando ciò non è possibile, è

consigliabile eseguire, almeno, una biopsia orientata utilizzando una sonda di Novak o una piccola curette.

### **Obiettivo dello studio**

A nostro avviso, tale tecnica è impiegabile in tutti quei casi con citologia anormale e colposcopia insoddisfacente in caso di cellule ghiandolari atipiche (AGC); ed in tutti quei casi con citologia sospetta per lesioni intraepiteliali non associata ad evidenti lesioni colposcopiche. Situazioni che, secondo le linee guida attuali (132), richiedono l'impiego di varie tecniche diagnostiche quali l'escissione chirurgica (conizzazione), la biopsia con ansa diatermica (LEEP) oppure il curettage del canale cervicale. Tali metodiche presentano vari inconvenienti fra i quali spicca l'eccessiva demolizione dei tessuti, nel caso della conizzazione, oppure la scarsa precisione, per quel che concerne la sede della lesione, quando si effettua il curettage del canale cervicale; oltre che l'incidenza di falsi negativi che si associa a quest'ultima tecnica e che possono portare lo specialista ad un "under-treatment".

Obiettivo del presente studio è quello di definire la sensibilità e la specificità dell'endocervicoscopia, studiando i vantaggi resi dalla diretta visualizzazione delle lesioni endocervicali non valutabili alla normale colposcopia. La corretta individuazione della sede della lesione è infatti, a nostro avviso, un obiettivo fondamentale, sia perché può permettere al ginecologo di eseguire un prelievo istologico mirato, sotto diretta visione isteroscopica, o quanto meno orientato, se si utilizzano strumenti come la sonda Novak o una piccola curette (al fine di ottenere un quantitativo maggiore di materiale), sia perché può aiutare il chirurgo a modulare la profondità dell'escissione.

## **I nostri dati**

Nel periodo compreso dal novembre 2006 al febbraio 2008, presso l'Unità di Colposcopia e Patologia-Cervicovaginale dell'Università di Napoli Federico II, sono state selezionate 95 pazienti con citologia cervico-vaginale ripetutamente positiva per sospetto di lesione intraepiteliale di alto grado (H-SIL) e colposcopia soddisfacente negativa o insoddisfacente.

L'età delle pazienti era compresa tra i 21 ed i 52 anni, con una media di 32,7 anni.

Non sono state arruolate, in questo studio, donne gravide, immunodepresse o con infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV +).

Tutte le pazienti arruolate hanno firmato un consenso informato per l'adesione allo studio e sono state, quindi, sottoposte ad endocervicoscopia.

L'endocervicoscopia è stata eseguita secondo la tecnica e con la strumentazione già descritta. Inoltre, per mantenere costante la pressione di erogazione del mezzo di distensione liquido è stata utilizzata una pompa di infusione (Endomat - Karl Stortz). Tutte le valutazioni endoscopiche sono state eseguite dallo stesso personale medico dedicato (G.L. e R.P.). Nei 60 casi iniziali, è stato impiegato un approccio tradizionale per l'applicazione dell'acido acetico. Mentre, nei successivi 35 casi l'approccio è stato direttamente vaginoscopico. L'intera procedura isteroscopica è stata videoregistrata dall'introduzione dell'isteroscopio fino alla sua estrazione ed ogni procedura è stata sempre conclusa con una valutazione della cavità uterina.

A tutte le pazienti che presentavano lesioni evidenti nel corso dell'endocervicoscopia, è stata eseguita una biopsia mirata con pinza 5 fr o con sonda Novak.



Mentre, in tutti i casi in cui non è stata riscontrata alcuna lesione in corso di endocervicoscopia, è stato eseguito un curettage del canale cervicale, in accordo con le linee guida di tutte le Società di Colposcopia (American Society, Anaes francese, Società Italiana, British Society).

Tutte le procedure diagnostiche sono state eseguite senza premedicazione farmacologica né anestesia locale.

Alla fine dell'endocervicoscopia e del curettage cervicale è stata eseguita una valutazione semiquantitativa della sintomatologia dolorosa assegnando un valore da 0 (nessun dolore) a 10 (dolore molto intenso) su Scala Analogica Visiva (VAS) di dieci centimetri (221).

**VAS :**



Inoltre, è stato valutato il profilo del grado di soddisfazione (Satisfaction rate) tracciato su una scala a 5 punti:

- 0 = nulla;
- 1 = minima;
- 2 = moderata;
- 3 = alta;
- 4 = altissima.

In accordo con le linee guida della SICPCV (Società Italiana di Colposcopia e Patologia Cervico Vaginale) edizione 2006 (222), tutte le pazienti arruolate in questo

studio, avendo una citologia ripetutamente positiva per sospetto di lesione intraepiteliale di alto grado, sono state poi sottoposte a conizzazione chirurgica a lama fredda. Questa tecnica escissionale è stata preferita alle altre perché non è gravata da alterazioni tessutali da danno termico e pertanto consente al patologo una corretta valutazione dei margini di resezione. Il materiale istologico ricavato (cono), prima di essere inviato dal patologo, è stato misurato ed è stato annotato il suo volume espresso in cc (cm<sup>3</sup>).

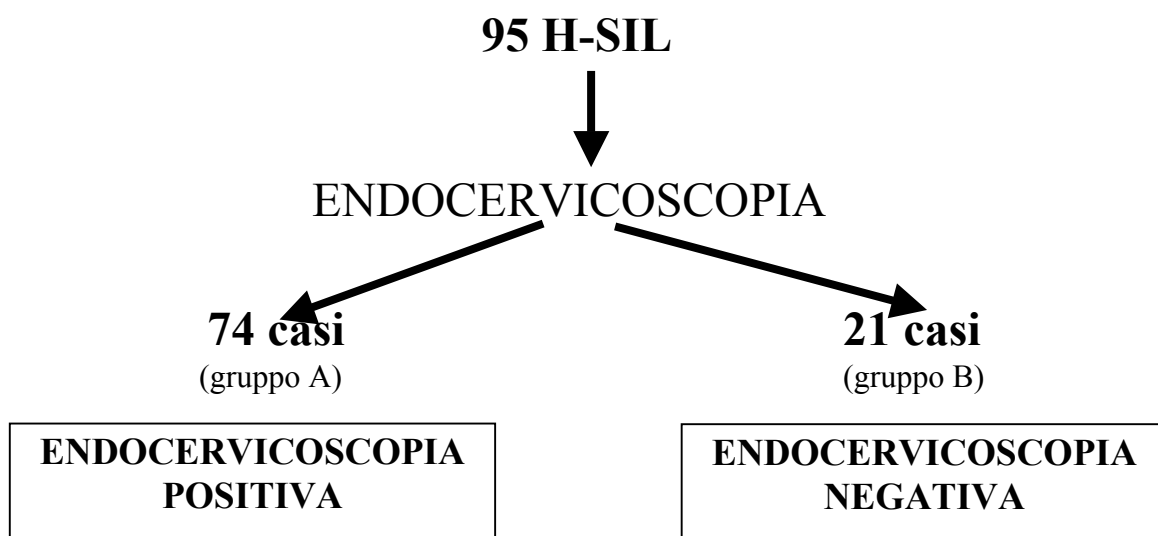
Sono stati quindi confrontati i risultati derivanti dall'esame istologico definitivo (su conizzazione) con quelli ottenuti dalle biopsie mirate, dal curettage e con le immagini raccolte nel corso dell'endocervicoscopia.

I risultati ottenuti sono stati espressi valutando la variabilità mediante deviazione standard (DS) ed elaborati statisticamente mediante il test SPSS 9.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA). Il test di Shapiro-Wilks è stato effettuato per valutare la distribuzione dei dati di tutte le variabili. Età, peso, parità, dimensioni dell'utero e il tempo di procedura hanno dimostrato una distribuzione normale e le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante il two-tailed t di Student test per i dati indipendenti. Le differenze di grado di soddisfazione e di dolore tra i due gruppi, sono stati valutati con il Wilcoxon sum rank test. Valori con  $P < 0.05$  sono stati considerati come statisticamente significativi.

## Risultati

Tra le 95 pazienti selezionate e sottoposte ad endocervicoscopia (tab.23), in 74 casi è stata descritta una zona di trasformazione anormale nel canale cervicale (gruppo A), mentre in 21 casi non è stata evidenziata alcuna alterazione nel corso dell'endocervicoscopia (gruppo B) (tab.22).

**Tabella 22:**



Nel gruppo A, in 9 casi sono state evidenziate aree di epitelio bianco sottile con o senza vascolarizzazione regolare (trasformazione anormale di grado 1) con prevalente sviluppo nel 1/3 inferiore del canale cervicale, in corrispondenza della giunzione squamo-colonnare (GSC). In 3 casi è stata evidenziata una lesione “a salto”, ovvero una doppia zona acetobianca separata da un tratto di epitelio cilindrico regolare, con modificazioni sia di tipo G2, in corrispondenza della GSC (1/3

inferiore), che di tipo G1 nel 1/3 medio del canale cervicale. In 58 casi sono state evidenziate zone di epitelio aceto-bianco spesso con sovrimpressione di mosaico e/o puntato irregolare (trasformazione anormale di grado 2). Tali lesioni, in 45 casi erano localizzate al 1/3 inferiore del canale cervicale, mentre nei rimanenti 13 casi sono state visualizzate nel 1/3 medio. Infine, in 4 casi l'endocervicoscopia ci ha permesso di evidenziare immagini suggestive di una possibile invasione, ovvero, vasi atipici, a decorso e calibro irregolari e grossolani, e sbocchi ghiandolari ispessiti e dilatati nel contesto di un tessuto a superficie irregolare, biancastra e facilmente sanguinante, che in 2 casi si estendevano fino al 1/3 medio del canale.

Al termine dell'endocervicoscopia, tutte le pazienti del gruppo A sono state sottoposte a biopsia mirata o orientata della lesione, mentre le pazienti del gruppo B sono state sottoposte a curettage non orientato del canale cervicale.

Terminata la procedura, è stato chiesto alle pazienti di valutare il pain-score ed il satisfaction rate. Da queste valutazioni è emerso che tutte le pazienti hanno mostrato una buona compliance all'endocervicoscopia, definendola una tecnica ben tollerabile e ripetibile ed hanno espresso un basso VAS score ( $2.9 \pm 0.5$ ), precisando che un lieve dolore veniva percepito prima dell'ingresso in cavità ed al momento della biopsia. Un VAS score di  $6.4 \pm 0.9$  è stato, invece, riferito dalle 21 pazienti sottoposte al curettage del canale cervicale. Nel corso di quest'ultima procedura, infatti, è stato espresso anche un dolore molto intenso e spesso è stata fatta richiesta di farmaci antalgici.

Dalle biopsie eseguite nel gruppo A sono risultati: 3 casi di displasia lieve (CIN 1); 17 casi di displasia moderata (CIN 2); 3 casi di displasia moderata-severa (CIN 2/3); 41 casi di displasia severa (CIN3); 2 casi è stato posto il sospetto di carcinoma

squamoso invasivo ed in altri 2 casi è stata refertata una atipia ghiandolare di alto grado. Infine, in 4 casi il prelievo è risultato negativo per patologia ed in altri 2 casi il materiale prelevato è risultato inadeguato per fare diagnosi.

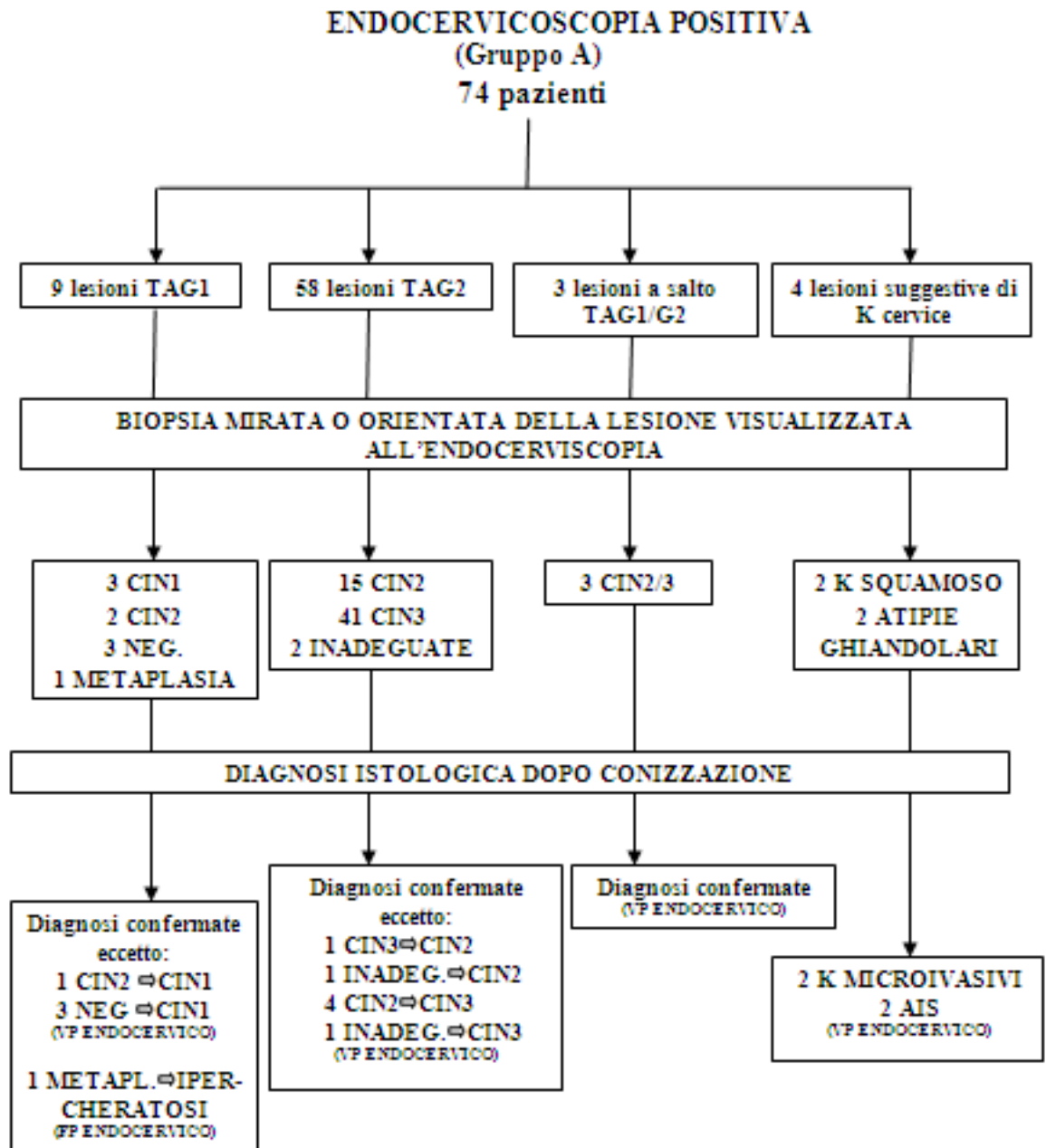
I risultati istologici ottenuti dai 21 curettage eseguiti nel gruppo B hanno mostrato: in 10 casi assenza di patologia; in 1 caso il materiale prelevato è risultato inadeguato per fare diagnosi; 1 caso di CIN 1; 3 casi di CIN 2 e 6 casi di CIN 3.

Tutte le 95 pazienti sono state sottoposte a conizzazione chirurgica a lama fredda. Nel gruppo A, la profondità dell'escissione è stata modulata in relazione alla localizzazione della lesione descritta all'endocervicoscopia. Mentre, nel gruppo B è stata eseguita una conizzazione standard con una profondità di circa 2/3 del canale cervicale (197).

Dall'analisi istologica delle 74 conizzazioni eseguite nel gruppo A sono risultati: in 7 casi un CIN 1; in 14 casi un CIN 2; in 3 casi è stato confermato il salto di lesione con alterazioni displastiche sia moderate che severe (CIN 2/3); in 45 casi un CIN 3; in 2 casi un carcinoma squamoso microinvasivo; in 2 casi un adenocarcinoma in situ. Infine, solo in 1 caso, che era risultato positivo all'endocervicoscopia, la conizzazione, come la biopsia, non ha evidenziato alcuna alterazione displastica ma solo una semplice ipercheratosi (FP dell'endocervico). Tutte le conizzazioni sono risultate con margini liberi da malattia, pertanto, anche nei casi di carcinoma squamoso e di adenocarcinoma, il trattamento è risultato adeguato (tab.23).



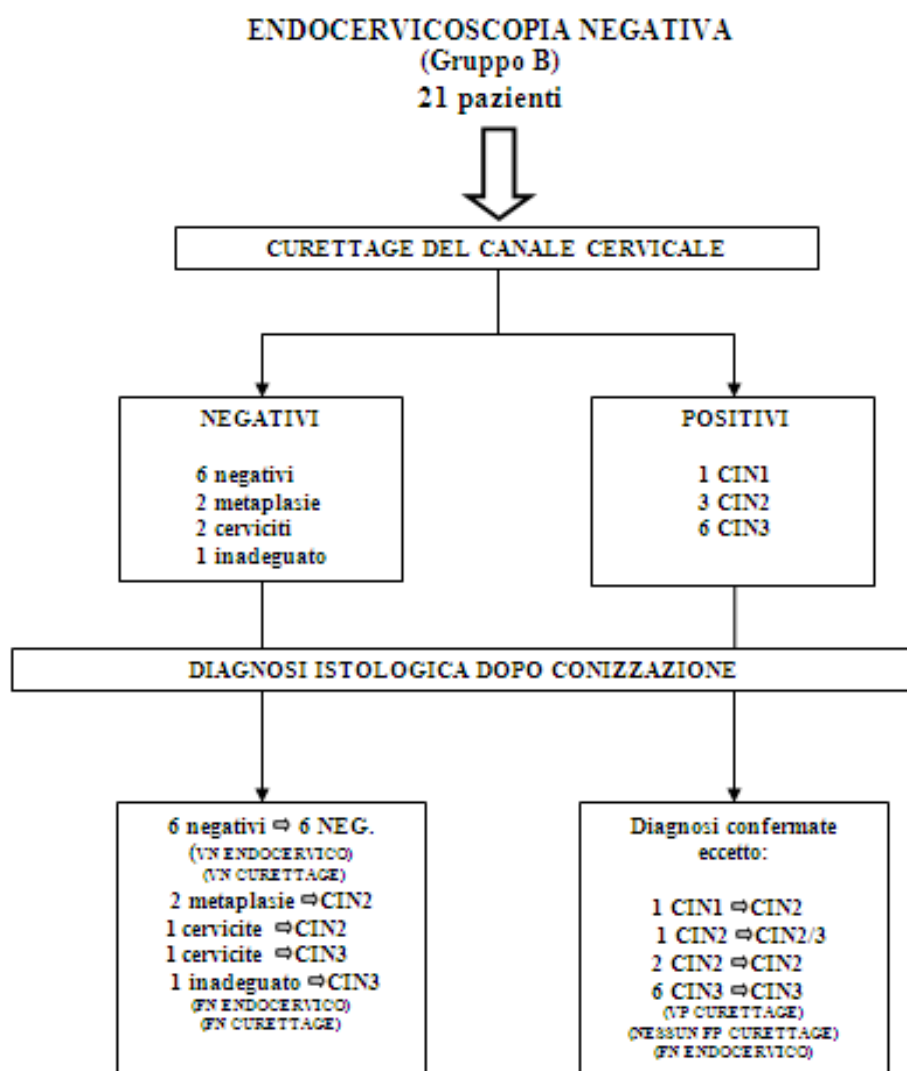
Tabella 4: pazienti gruppo A



Nel gruppo B, l'analisi istologica delle 21 conizzazioni, in 6 casi, risultati negativi all'endocervicoscopia ed al curettage del canale, ha confermato l'assenza di lesione con referto di cervicite o metaplasia immatura (VN); in 5 casi, in cui il curettage era risultato negativo o inadeguato, ha dato 3 CIN 2 e 2 CIN 3 (FN del

curettage); in altri 3 casi è stato diagnosticato un CIN 2; in 1 caso un CIN 2-3; in 6 casi un CIN 3. In 8 di questi 21 casi, negativi all'endocervicoscopia, la lesione era ad esclusivo sviluppo intraghiandolare ed in 7 casi il margine endocervicale del cono (apice) è risultato interessato dalla patologia, pur avendo eseguito un cono molto ampio (4 cc) (tab.5).

**Tabella 5: pazienti gruppo B**



Per quel che riguarda le dimensioni dei coni, i volumi asportati nel gruppo A sono risultati sostanzialmente più piccoli rispetto a quelli del gruppo B, variando dai 2 cc ai 4 cc nel gruppo A contro i 4 cc standard del gruppo B.

**Tabella 25: risultati.**

N	ENDOCERVICOSCOPIA		BIOPSIA		CURETTAGE		CONIZZAZIONE		
							ISTOLOGICO	<i>VOLUME</i>	<i>MARGINI</i>
3	+	G1 inf	+	CIN1	/	/	CIN1	2 cc	Liberi
1	+	G1 inf	+	CIN2	/	/	CIN1	2 cc	Liberi
3	+	G1 inf	-	Negativo	/	/	CIN1	2 cc	Liberi
1	+	G1 inf	+	CIN2	/	/	CIN2	2 cc	Liberi
1	+	G1 med	-	Metaplasia	/	/	Ipercheratosi	3,5 cc	Liberi
3	+	G1/G2 med-inf	+	CIN2/3	/	/	CIN2/3	4 cc	Liberi
7	+	G2 inf	+	CIN2	/	/	CIN2	2,4 cc	Liberi
1	+	G2 inf	+	CIN3	/	/	CIN2	2,4 cc	Liberi
4	+	G2 med	+	CIN2	/	/	CIN2	3,5 cc	Liberi
1	+	G2 med	-	Inadeguato	/	/	CIN2	3,5 cc	Liberi
3	+	G2 inf	+	CIN2	/	/	CIN3	2,4 cc	Liberi
34	+	G2 inf	+	CIN3	/	/	CIN3	3 cc	Liberi
1	+	G2 med	-	Inadeguato	/	/	CIN3	3,5 cc	Liberi
1	+	G2 med	+	CIN2	/	/	CIN3	3,5 cc	Liberi
6	+	G2 med	+	CIN3	/	/	CIN3	4 cc	Liberi
2	+	K inf	+	k squam	/	/	K microinvasivo	4 cc	Liberi
2	+	K inf-med	+	atipie gh	/	/	AIS	4 cc	Liberi
6	-	/	/	/	-	negativo	cervicit/metapla	4 cc	Liberi
1	-	/	/	/	-	metaplasia	CIN2	4 cc	Apice
1	-	/	/	/	-	metaplasia	CIN2	4 cc	Liberi
1	-	/	/	/	-	cervicite	CIN2	4 cc	Apice
1	-	/	/	/	-	cervicite	CIN3	4 cc	Apice
1	-	/	/	/	-	Inadeguato	CIN3	4 cc	Apice
1	-	/	/	/	+	CIN1	CIN2	4 cc	Apice
2	-	/	/	/	+	CIN2	CIN2	4 cc	Liberi
1	-	/	/	/	+	CIN2	CIN2/3	4 cc	Apice
1	-	/	/	/	+	CIN3	CIN3	4 cc	Apice
1	-	/	/	/	+	CIN3	CIN3	4 cc	Liberi
1	-	/	/	/	+	CIN3	CIN3	4 cc	Liberi
1	-	/	/	/	+	CIN3	CIN3	4 cc	Liberi
2	-	/	/	/	+	CIN3	CIN3	4 cc	Liberi

Alla luce dei risultati presenti in letteratura, l'esame più sensibile per lo studio del canale cervicale è rappresentato dal pap-test, per porre il sospetto della lesione, e dalla conizzazione, per porre diagnosi di certezza ed effettuare un adeguato trattamento. In questi ultimi anni, si sono diffuse e/o sviluppate, varie tecniche per lo studio del canale cervicale, al fine di interporre tra il sospetto diagnostico (pap-test) e

la terapia (conizzazione) un maggior numero di informazioni utili a definire le caratteristiche e la localizzazione delle lesioni endocervicali.

Da sempre il canale cervicale, data la sua localizzazione, conformazione e, spesso, impenetrabilità, ha offerto svariate difficoltà analitiche. Sono molte, nel tempo, le tecniche che sono state impiegate per il suo studio: tecniche cieche, a visione diretta o escissionali, ma ognuna di queste ha mostrato dei notevoli limiti diagnostici.

Tra le tecniche cieche ricordiamo il curettage cervicale. Esso, ad oggi, è considerato la metodica di scelta per lo studio del canale cervicale ed un utile esame complementare alla colposcopia (206-209). Tale tecnica, tuttavia, è gravata da una elevata percentuale di falsi negativi (FN) dovuti al difficile ed impreciso campionamento della mucosa endocervicale. I campioni, infatti, non possono essere rappresentativi dell'intera mucosa endocervicale in quanto, asportando solo una parte di tessuto, nel 12% dei casi non risultano essere adeguati (210).

Tra le metodiche a visione diretta ricordiamo la colposcopia e la microcolpoisteroscopia. La prima, grazie ai suoi validi principi, risulta un'ottima tecnica per la valutazione di lesioni confinate all'esocervice, fino a pochi millimetri all'interno dell'orifizio uterino esterno (OUE), ma non è valida per lo studio di lesioni estese o situate più in alto nel canale cervicale. La microcolpoisteroscopia a contatto, o microcolposcopia, viene normalmente impiegata per ottenere una visione diretta "in vivo" della morfologia cellulare dell'esocollo, dell'endocollo e quindi della giunzione squamo-colonnare con criteri citopatologici. Questa tecnica, tuttavia, presenta limiti di sensibilità e necessita di operatori esperti con adeguate conoscenze citopatologiche che devono aver effettuato un buon training di lettura citologica al



microscopio ottico. Per tali motivi questa tecnica non è entrata mai a far parte della normale routine ginecologica.

Il metodo escissionale (conizzazione) viene eseguito allo scopo di asportare un frammento conico o semisferico di cervice uterina con fini diagnostici e terapeutici, tenendo sempre in considerazione la forma della cervice e la distribuzione topografica delle varie anomalie epiteliali. Può essere eseguita con ansa diatermica o ago a radiofrequenza, con lama fredda e con laser CO<sub>2</sub>. Un aspetto importante è rappresentato dalla valutazione dell'estensione della lesione displastica e dello stato dei margini di resezione chirurgica. Questi parametri sono importanti dal punto di vista prognostico in termini di probabilità di recidiva e di persistenza di lesione (212). Infatti, l'interessamento del margine di resezione endocervicale, associato al grado della lesione displastica, rappresenta il fattore maggiormente predittivo di persistenza o di recidiva della lesione (213). Le dimensioni del cono, pertanto, sono cruciali. La conizzazione poco profonda può essere eseguita nei casi in cui la lesione è confinata colposcopicamente alla esocervice o alla parte inferiore del canale cervicale. Se la lesione si estende in alto, nel canale, al di fuori della visuale del colposcopio, dovrebbero essere escissi circa i 2/3 del canale cervicale. Quindi un cono può essere largo e poco profondo o stretto ed allungato, a seconda della sede e delle dimensioni della lesione (196).

Da queste precisazioni appare evidente che l'impiego del metodo escissionale, come tecnica diagnostica, spesso comporta una eccessiva demolizione dei tessuti.

Da qui nasce l'esigenza di una tecnica diagnostica di imaging, per il canale cervicale, che superi i limiti della colposcopia ma soprattutto le imprecisioni delle attuali metodiche "cieche", senza dover ricorrere alle escissioni diagnostiche. Una

tecnica, come l'endocervicoscopia, permette, infatti, di individuare correttamente la sede della lesione.

Da questo studio, infatti, è emerso che la diretta visione endoscopica del canale cervicale, preparato con acido acetico, permette di studiare la gran parte delle lesioni squamose che interessano il canale cervicale, eventuali lesioni a salto e atipie ghiandolari. E' possibile, infatti, riconoscere alterazioni della superficie, dello spessore e composizione dell'epitelio e della vascolarizzazione del connettivo, che si traducono in immagini acetoreattive, a bordi netti o sfumati, isolate o associate, come epitelio irregolare, puntato, mosaico, sbocchi ispessiti, vasi atipici ecc.

Dai nostri dati emerge, inoltre, un confronto (intrinseco, indiretto) tra l'endocervicoscopia ed il curettage del canale cervicale da cui si evince (tab.26,27) che l'endocervicoscopia è una tecnica più affidabile mostrando una sensibilità dell'83% contro il 66% del curettage. Questa tecnica ha permesso di riconoscere e localizzare le lesioni endocervicali in 73 casi su 89 ed in 69 casi su 74 ha permesso di eseguire un prelievo istologico soddisfacente ed adeguato. Inoltre, dall'analisi dei dati è risultata anche una spiccata corrispondenza tra il grado di anormalità delle lesioni, descritto all'endocervicoscopia, e l'alterazione istologica evidenziata nelle sezioni del cono chirurgico (tab.28).

**Tabella 7:**

	GRUPPO A 74 pazienti	GRUPPO B 21 pazienti	TOTALE 95 PAZIENTI
V.P. ENDOCERVICOSCOPIA	73	/	73
F.N. ENDOCERVICOSCOPIA	/	15	15
V.N. ENDOCERVICOSCOPIA	/	6	6
F.P. ENDOCERVICOSCOPIA	1	/	1
V.P. CURETTAGE	/	10	10
F.N. CURETTAGE	/	5	5
V.N. CURETTAGE	/	6	6
F.P. CURETTAGE	/	/	/

V.P.= Veri Positivi; F.N.= Falsi Negativi; V.N.= Veri Negativi; F.P.= Falsi Positivi

**Tabella 27:** Sensibilità e Specificità, due metodiche a confronto

	SENSIBILITA'	SPECIFICITA'
ENDOCERVICOSCOPIA	83%	85,7%
CURETTAGE	66%	100 %

SENSIBILITA' =  $\frac{V.P.}{V.P. + F.N.}$  = capacità di individuare i malati

SPECIFICITA' =  $\frac{V.N.}{V.N. + F.P.}$  = capacità di individuare i sogg. sani

**Tabella 28:** Corrispondenza istologica

TECNICA	GRADO DI ATIPIA	ISTOLOGICO DEFINITIVO	CORRISPONDENZA
<b>ENDOCERVICO- SCOPIA</b> <b>74 pazienti</b>	58 G2 3 G1/G2 9 G1 4 sospetti K	45 CIN III 3 CIN II/III 14 CIN II 7 CIN I 2 microinvasivi 2 AIS 1 ipercheratosi	<b>83%</b>
<b>CURETTAGE</b> <b>21 pazienti</b>	6 CIN 3 3 CIN 2 1 CIN 1 1 inadeg. 6 neg. 2 cervicit 2 metapl	8 CIN III 1 CIN II/III 6 CIN II 6 Cervic/metapl	<b>76%</b>

L'unico Falso Positivo (FP) dell'endocervicoscopia è risultata una ipercheratosi del 1/3 medio del canale cervicale che è facilmente confondibile con un epitelio bianco.

Inoltre, è importante segnalare che dei 15 casi in cui non è stato possibile riconoscere la lesione all'endocervicoscopia, l'esame istologico definitivo ha evidenziato che: in 2 casi la lesione era ad esclusivo sviluppo intraghiandolare, senza alcuna manifestazione sulla superficie del canale cervicale; in 7 casi la lesione era, verosimilmente, molto alta nel canale, dato che, pur avendo eseguito una escissione molto ampia (circa i 2/3 del canale cervicale), l'apice è risultato coinvolto.

Il 1/3 superiore del canale cervicale è una porzione difficile da indagare, infatti, dato il suo fisiologico restringimento, necessita dell'impiego di pressioni più alte, che

alterano la superficie della mucosa. Non infrequenti, poi, risultano essere i fenomeni di riflessione della luce. Altre situazioni che possono inficiare il riconoscimento delle lesioni endocervicali sono: sindromi aderenziali che restringono il lume del canale cervicale, oltre ad alterarne la superficie; serrata stenosi dell'OUE; presenza di grossi polipi endocervicali; nonché l'impreciso impiego della tecnica.

Inoltre, è da notare che, in tutti i casi in cui la lesione è stata visualizzata e localizzata mediante l'endocervicoscopia, l'escissione chirurgica è risultata adeguata, comprendendo sempre al suo interno i margini della lesione. Nei tre casi di "lesione a salto" solo lo studio visivo del canale cervicale ha permesso una completa escissione della patologia precancerosa che altrimenti sarebbe rimasta misconosciuta. Tale eventualità avrebbe probabilmente determinato una progressione della malattia e la necessità di un nuovo o più radicale intervento chirurgico.

Analizzando i FN dell'endocervicoscopia (15 pazienti) si può evidenziare che in ben il 46% dei casi (7 pazienti) l'esame istologico della conizzazione ha mostrato la presenza di lesione sul margine di resezione endocervicale, probabilmente in relazione alla impossibilità di modulare la profondità del cono chirurgico. Come evidenziato da alcuni studi, questo dato comporta un rischio di persistenza/recidiva circa doppio rispetto ai casi in cui i margini del cono, in particolare quello endocervicale, risultano liberi da malattia (223-226).

Infine, in tutti i casi in cui è stato possibile modulare l'escissione, il trattamento non solo è stato efficace, ma è risultato anche più conservativo. Infatti, i volumi dei coni eseguiti nel gruppo A sono risultati mediamente più piccoli rispetto a quelli eseguiti nel gruppo B (3 cc vs 4cc). Questo è un aspetto da non trascurare considerando che le donne trattate erano, per lo più, in età fertile (età media 32,7



anni) e, pertanto, era importante cercare di preservarne il più possibile la capacità riproduttiva.

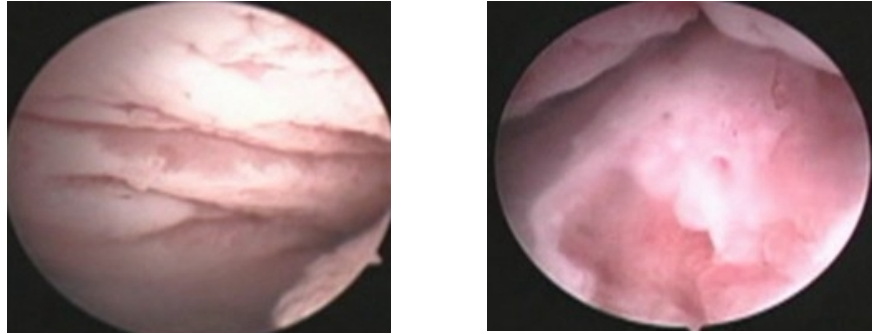
Inoltre, valutando i risultati derivati dall'analisi del VAS score e del Satisfaction rate è emerso che l'endocervicoscopia è una tecnica diagnostica ben tollerata ed associata ad una elevata compliance da parte delle pazienti. Infatti, molte pazienti interrogate, al termine delle due procedure, sull'intensità del dolore percepito e sull'accettabilità dell'esame, hanno di gran lunga preferito l'endocervicoscopia al curettage cervicale. Tutte le pazienti si sono mostrate disposte a ripetere l'endocervicoscopia, se fosse stato necessario, ed hanno espresso pareri favorevoli alla diffusione di questa nuova tecnica.

In definitiva possiamo senz'altro affermare che le prospettive di utilizzo dell'endocervicoscopia sono piuttosto ampie e che la sua affidabilità diagnostica è sufficientemente elevata. A questo aggiungiamo la considerazione, non secondaria, che la sua tecnica di esecuzione relativamente semplice le consente di essere appresa senza eccessive difficoltà, favorendone, quindi, la diffusione.

Noi riteniamo utile, pertanto, l'esecuzione dell'endocervicoscopia in tutti quei casi in cui: esiste una discordanza tra referto citologico ed esame colposcopico; la giunzione squamo-colonnare non risulta visibile, in presenza di citologia positiva; la lesione risale nel canale cervicale; viene sospettata una lesione ghiandolare e, soprattutto, ogni qual volta è necessario effettuare un intervento demolitore della cervice, sia che si tratti di LEEP ("Loop Electrosurgical Excision Procedure"), lasercilindrizzazione o conizzazione a lama fredda.

L'obiettivo per il prossimo futuro sarà di incrementare ulteriormente l'attendibilità di questa tecnica migliorando le modalità di prelievo istologico.

Attualmente, infatti, per i limiti legati alla strumentazione endoscopica in uso, non è sempre possibile eseguire delle valide biopsie mirate.



**Figura 39:** Immagini endocervicoscopiche

# Endocervicoscopy: a new technique for the evaluation of endocervical mucosa

Giada Lavitola,

Roberto Piccoli,

Attilio Di Spiezio Sardo,

Giuseppe Bifulco,

Marialuigia Spinelli,

Angelo Cavallaro,

Carmine Nappi

*Department of Obstetric, Gynaecology and Pathophysiology of Human Reproduction, University of Naples Federico II, Italy*

## Abstract

**Study Objective:** to propose and validate “endocervicoscopy”: a new technique for the evaluation of the endocervical mucosa

**Design:** prospective trial

**Setting:** Department of Obstetrics, Gynaecology and Pathophysiology of Human Reproduction University of Naples Federico II

**Patients:** 95 consecutive patients with repeatedly positive cervicovaginal cytology for high-grade squamous intraepithelial lesion (H-SIL) and negative or unsatisfactory colposcopy.

**Interventions:** endoscopic evaluation of the endocervical mucosa, performed with an office continuous-flow hysteroscope after application of acetic acid 5%. Patient diagnosed with abnormal cervical findings (A group) underwent targeted biopsies of the detected lesions. Negative patients at endocervicoscopy (B group) underwent blind curettage of the cervical canal. Finally, both groups underwent a cold knife conization.

**Main outcome measures:** sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of endocervicoscopy with targeted biopsies and curettage, compared to the final histology (on conization)

**Results:** Endocervicoscopy showed a high sensitivity (83%), a high specificity (86%), a high PPV (99%), a low NPV (29%) and accuracy (83%), while cervical curettage showed a low sensitivity (66%), a high specificity (100%), a high PPV (100%), a low NPV (54%) and accuracy (76%).

**Conclusions:** endocervicoscopy seems to be a safe and effective technique in the office setting, with high-diagnostic accuracy. The correct localization of the lesions allows to modulate the cone excision, favouring an ultra-conservative surgical intervention, thus preserving the future fertility of women.

## Introduction

During recent years, an increasing incidence of cervical precancerous and cancerous lesions in young women has been recorded. These data, obtained from cervicovaginal cytology, could be mainly explained by modern, freer sexual habits (i.e: more precocious sexual activity, a major number of sexual partners, as well as sexual promiscuity in general) leading to a major and easier diffusion of the Human Papilloma Virus (HPV) (1).

Optimal treatment of precancerous and cancerous lesions should be based on detailed knowledge of development and spread of the lesion, reliable treatment methods, and any concomitant indications (2).

Cervical lesions can be treated by different techniques, including ablative techniques (i.e.: cryosurgery, electrocautery, cold coagulation, or laser ablation) and excisional techniques (i.e.: cold-knife conization or loop diathermy conization). Hence, since the prevalence of cervical lesions is steadily increasing among young women, the goal of standard treatment of care is to perform ultra-conservative surgery, in order to preserve the future fertility of these women.

The most modern diagnostic and therapeutic techniques aim to preserve the cervix in order to perform an adequate cytology and colposcopic follow-up; for this reason, the techniques causing the slop of squamous-columnar junction or the stenosis of the cervical canal should be avoided.

Available literature shows that the epithelial lesions can be persistent in 16% to 34% of the cases, even when the best and most recent treatment is utilized (surgical excision of the transformation zone) (3-6). These data may be explained by the deep localization in the cervical canal of most of the intra-epithelial lesions, which thus remain un-diagnosed.

For these reasons, new techniques allowing a precise diagnosis and topography of the endocervical lesions in order to guarantee the most appropriate depth of the surgical excision are needed.

The aim of our study is to propose and validate a new technique for the evaluation of the endocervical mucosa, which combines the instrumentation of conventional hysteroscopy with the classification system of colposcopy: the “endocervicoscopy”.



## **Materials and Methods**

The endocervicoscopic procedure is carried out by means of :

1. A 4 mm continuous-flow office operative hysteroscope with an oval profile (Bettocchi Office Hysteroscope “size 4”, Karl Storz, Tuttlingen, Germany) and with a 30° rod lens 1.9 mm optic.
2. A xenon light source of 175 watt (Karl Storz, Tuttlingen, Germany). Since the cervical channel is a small-sized one, the light intensity should be as low as possible, in order to avoid the reflection phenomenon, which may hamper the identification of the acetowhite areas.
3. A digital endo-camera (Image 1 HD; Karl Storz, Tuttlingen, Germany).
4. A high resolution monitor, equipped with a video-recording system.
5. Distension of the endocervical canal is obtained using saline solution (7) with pressure being automatically controlled by an irrigation-suction electronic device (Endomat, Karl Storz, Tuttlingen, Germany). Normal saline is used because of better patient tolerance and cost efficiency; furthermore it offers the main advantage of clearing blood, blood clots and debris which may frequently hamper the endoscopic view. The endocervical pressure should be set at values no higher than 30-50 mmHg. Such values guarantee an optimal visualization of the endocervical mucosa, avoiding alterations or damage to the morphology, the staining and the vascularization of the epithelial tissue.

The first step of endocervicoscopy is the application of acetic acid 5% on the cervix (step I).

Two different techniques may be used:

- A) The cervix is revealed using a speculum. After wiping clean the cervix, acetic acid 5% is applied with a cotton applicator (cotton balls held by sponge forceps, or rectal swabs) or with a small sprayer; then, a needle-free insulin syringe (1 ml) is inserted into the Internal Uterine Ostium (IUO) and the acetic acid solution is injected into the endocervical canal, applying a mild pressure against the piston.

B) As an alternative, a vaginoscopic approach is used (8). The vagina, being a cavity, may be distended by introducing the liquid distension medium through the hysteroscope placed into the lower vagina at the same pressure (30-40 mmHg) used for the subsequent distension of the uterine cavity. Then the scope is guided towards the external uterine ostium (EUO) and through the cervical canal. As soon as the EUO is visualized, the irrigation of saline is stopped and a syringe with 5% acetic acid is connected to the inflow channel of the hysteroscope. In this way the impregnation of the cervix may be directly and clearly visualized, provided that a couple of minutes elapse before re-connecting the continuous-flow irrigation to the hysteroscope.

The procedure continues with a panoramic view of the cervix, as well as of the transformation zone, in accordance with the main colposcopic criteria (step II: esocervicoscopy). In particular, the squamo-columnar junction (SCJ), a visible line seen on the ectocervix or within the distal canal, which demarcates endo-cervical tissue from squamous tissue, should be identified; the course and localization of the SCJ should be precisely detected. Nabothian cysts, cervical polyps and typical transformation areas, should be precisely located and characterized.

The trophism, the vascularization and the morphology of the endocervical mucosa should be then evaluated, taking into consideration the physiologic changes of this mucosa during menstrual cycle and aging (step III: endocervicoscopy) (9).

In fertile women, it is preferable to perform the procedure during the pre-ovulatory phase, since the amount and the viscosity of the mucus, produced by the endocervical mucosa during the post-ovulatory phase, may impair the performance of the examination. The endoscopic views are quite typical: the anterior and the posterior columns of squamous epithelial cells, which present a pseudo-polypoid aspect, as well as the laterally extended glandular crypts, are revealed; the arbour vitae extends longitudinally throughout the endocervix (Fig. 1A) and on the IUO. In the post-menopausal period, the arbor vitae is atrophic and the mucosal folds disappear; the glandular crypts become fibrous and thin. The cervical mucus is scanty and the mucosal thickness is rather reduced, thus, because of the transparency of the underlying fibrous tissue; the mucosal surface is highly

light-reflective and bleeds easily upon instrument touch. Furthermore, a severe stenosis of the IUO is frequent, leading to a difficult passage for the hysteroscope.

It should be kept in mind that, during the peri/post-menopausal period, the SCJ rises inside the cervical canal, thus it cannot be visualized at the colposcopic examination. Therefore, an endocervicostomy is particularly indicated. Finally, the atypical transformation areas should be identified and localized in respect to the SCJ and the EUO.

In accordance with the “International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy” [IFCPC], all the visible lesions are classified under proper categories on the basis of the severity of the lesion (Tab. 1, Fig. 1B and 1C) (10).

In order to standardize the terminology, the cervical canal can be conventionally divided into 3 parts: lower 1/3, middle 1/3, upper 1/3. In the latter segment a physiologic stenosis is observed, thus, an increase of the supply pressure to 60-70 mmHg may be necessary, in order to over-pass the IUO and gain access to the uterine cavity. Indeed, endocervicostomy is always completed by an examination of the uterine cavity (step IV: hysteroscopy).

Such a technique requires the examination of the cervical tissue to be performed as the tip of the hysteroscope rises inside the cervical channel. Indeed, once the scope has been completely inserted, mucosal traumatism, upon instrument touch, may hamper a correct identification of the lesions.

In order to obtain an optimal endoscopic view, the tip of the hysteroscope and the cervical tissue should be separated by a distance of a few millimetres; a higher or a lower image magnification is obtained by slowly advancing or withdrawing the instrument, respectively.

The anterior and posterior wall of the cervical channel can be carefully examined, when advancing longitudinally along the length of the cervix with the hysteroscope; conversely, the lateral walls are examined while gently rotating the tip of the scope left/right into the cervical channel. Once an epithelial lesion has been detected, the tip of the optic moves nearer the lesion, in

order to magnify the image on the monitor, thus allowing for a more detailed analysis of the pathological tissue.

Generally, the entire endocervicoscopic procedure lasts about 2-7 minutes, depending on the technical skill of the operator as well as the conditions of the cervix.

During the examination a biopsy can be performed using 5Fr grasping forceps. As an alternative, a Novak suction biopsy or a small curette can be used.

## **Our experience**

From November 2006 to February 2008, 95 consecutive patients [mean age: 32.7 years, (range:21-52)], with repeatedly positive cervicovaginal cytology for high-grade squamous intraepithelial lesion (H-SIL) and negative or unsatisfactory (i.e. non-visible squamo-columnar junction) colposcopy, were enrolled in our study.

Pregnant women, immunocompromised/HIV infected patients, as well as patients who were unable to grant informed consent, were excluded from the study.

All endocervicoscopies were performed without pharmacological premedication or local anesthesia. Step I (application of acetic acid 5% on the cervix) was performed with traditional approach in the first 60 patients, while the vaginoscopic technique was performed in the latter 35 cases. Step II (esocervicoscopy) and III (endocervicoscopy) were performed in all cases, while step IV (hysteroscopy) failed in 3 out of 95 cases due to severe stenosis of IUO.

All the identified endocervical lesions were recorded.

In 74 out of 95 cases (group A) abnormal findings in the cervical canal were identified, while in the other 21 cases (group B) no endocervical lesions were detected.

After endocervicoscopy, group A underwent targeted biopsies of the detected lesions, while group B underwent blind curettage of the four walls of the cervical canal, in accordance with the guidelines of the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP) (11). Eight out of 21 patients from group B required local anesthesia, in order to reduce discomfort during sampling and thus to perform an adequate curettage of all four cervical walls.

In accordance with the guidelines of ASCCP and SICPCV (12), the starting diagnosis of all patients (repeatedly positive cervicovaginal cytology for H-SIL) required a surgical cold knife conization. In group A, the depth of excision varied in relation to the location of the lesion, while in group B a standard conization was performed, with a depth of 2 / 3 of the cervical canal.

The volume of cone biopsy of patients from group A was significantly smaller than that of group B (group A:  $3,03 \pm 0,61$  cc vs group B:  $4,07 \pm 0,24$  cc;  $p < 0,05$ ).

The results arising from the final histology (on conization) were then compared with those obtained from targeted biopsies and curettage (Fig. 2).

All patients from group A had free cone margins, while 7 (33%) out of 21 patients from group B had lesion extended to the apex of the cone.

The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy for endocervicoscopy and blind endocervical curettage were calculated (Tab. 2). A P value  $< 0,05$  was considered statistically significant.



## **Discussion**

Currently, according to the available literature, the most sensitive test for diagnosing endocervical lesions is the pap-test while conization is the gold standard for diagnosing and proposing correct treatment. In recent years, further techniques for the study of the cervical canal have been developed and become widespread, providing additional information lying between that furnished by the pap-test diagnosis and that resulting from conization treatment.

The cervical canal, due to its location, shape, and impenetrability, has constantly shown several analytical difficulties. Over time, many techniques have been used to study it: blind techniques and direct vision methods, which include direct sight and the excisional method; however, each of them showed significant diagnostic limitations.

Among the blind techniques we recall cervical curettage. It is generally recognized as the most appropriate method for studying the cervical canal and is a useful complementary test to colposcopy (13-16). However, this technique is burdened by a high rate of false negatives due to the difficult and imprecise sampling of the endocervical mucosa. Indeed, it is often not representative of the endocervical mucosa, removing only a part and in 12% of cases the sample is not appropriate for lack of material (17). Our results are in accordance with the literature showing a low sensitivity (66%) and a high specificity (100%). Furthermore, cervical curettage, due to its invasiveness, is quite often performed under local or general anesthesia. In our study, cervical curettage was performed in the office-based setting. However, the procedure was referred by most patients as moderate/severe uncomfortable and in 8 cases required the administration of local anesthesia.

Among the direct vision methods there are colposcopy and microcolpoisteroscopy.

Former, thanks to its valid principles, is an excellent technique for the evaluation of lesions confined to the esocervix up to a few millimeters within the OUE, but it is not valid for the study of lesions located or expanded deeper in the cervical canal.

Latter, also called microcolpoisteroscopy in contact, is normally used to obtain "in vivo" vision of the cell morphology of esocervix, endocervix as well as the squamous-columnar junction

with cytopathologic criteria. This technique, however, has limitations in sensitivity and requires an operator with cytopathologic knowledge, who must have had good training in reading cytology with a microscope and for this reason it has never become part of daily gynecological routine.

The excisional method (conization) is performed in order to remove a conical or semi-conical fragment of the uterine cervix, with diagnostic and therapeutic purposes, taking into account the shape of the cervix as well as the topographic distribution of the epithelial abnormalities. It can be performed with a diathermic loop or a radiofrequency needle, with cold blade and with CO<sub>2</sub> laser. An important aspect is the evaluation of the extension of the dysplastic lesion and the surgical resection margins. Such parameters are important from a prognostic point of view in terms of probability of recurrence and persistence of the lesion (2). Indeed, the extension of the endocervical resection margin, associated with the degree of dysplastic lesion, is the most predictive factor of persistence/recurrence of the lesion (18). The modulation of the volume of cone biopsy should not be neglected considering that women who are treated are mostly of childbearing age. Therefore, it is important to try to preserve as much as possible the reproductive performance.

Currently, new diagnostic imaging techniques for the cervical canal are needed, in order to complete colposcopic imaging and especially to counter the diagnostic inaccuracy of the “blind” methods.

A new diagnostic imaging technique, such as endocervicoscopy, may allow gynaecologists to identify the location of the lesion, overcoming the limits of the current techniques

Indeed, from this study it has emerged that the direct endoscopic vision of the cervical canal prepared with acetic acid, that is endocervicoscopy, enabled us to diagnose the majority of squamous lesions of the cervical canal.

The possibility to reach a precise diagnosis and topography of the endocervical lesions allowed the surgeons to perform an adequate surgical excision. Indeed despite a significant smaller volume of the cone biopsy, all specimens of group A had free margins.

The only false positive (FP) of endocervicoscopy was diagnosed as hyperkeratosis at pathological analysis of both targeted biopsy and cone biopsy. Indeed such condition may be easily misunderstood with an aceto-white epithelium.

Two endocervical lesions diagnosed as TAG2 at endocervicoscopy, resulted inadequate at histological diagnosis after targeted biopsy and resulted CIN3 at histological analysis of cone biopsy after conization. These inadequate specimens are mostly related to the difficulties encountered by the operator when performing targeted biopsies with conventional 5 Fr instruments in a very small cervical canal, which usually does not allow a wide opening of the branches.

Three “jump lesions” were detected at endocervicoscopy. The diagnosis of such lesions can be possible only at a direct endoscopic view of the endocervical mucosa. The identification of such rare lesions allowed the operator to perform an adequate conization with free margin, thus avoiding an over-treatment with alteration of subsequent fertility.

In our trial, endocervicoscopy showed a high sensitivity (83%) and specificity (86%) with a PPV of 99%. The low NPV of endocervicoscopy was related to the high percentage of false negative (FN) (15.8%). However, even when a blind curettage was performed in such cases, in 11 out of 15 lesions, histological analysis of specimens after curettage continued to be negative or inadequate.

However, an analysis of the FN rate of endocervicoscopy (15 patients) is mandatory. In 2 out of these 15 cases, the lesion had total intraglandular development, without any expression on the surface of the cervical canal.

In 7 other cases, the lesion was probably very deep into the cervical canal. Indeed, the upper 1 / 3 of the cervical canal is a difficult portion to investigate due to its physiological narrowing. Thus, higher pressures are needed, which may alter the mucosal surface. Furthermore, phenomena of light reflection are also not uncommon in such cases. Even at curettage, the “scrabbing” of the upper endocervical mucosa may be difficult.

In 3 other cases an endocervical polyp and severe adhesions were recorded at endocervicoscopy. This may have hampered the evaluation of all the walls of the endocervical canal. The last 3 cases may be explained by the effects of the learning curve of the operator.

The importance of identifying and localizing the lesions is also highlighted by the high percentage of lesions extended to the margins of cone biopsies of group B. Indeed, despite a significantly higher volume of cone biopsies of group B, margins were not free of disease in 33% of cases. This percentage is even higher (7/15: 46%) if we only consider the patients from group B with disease.

Furthermore, it should be noted that in all cases where lesions were identified with endocervicoscopy, surgical excision was adequate, including the inside margins of the lesion.

## **Conclusions**

Endocervicoscopy seems to be a safe and effective technique, with high-diagnostic accuracy, performable in the office-based setting without the need of anaesthesia/analgesia and high patient compliance.

In brief, we propose to perform endocervicoscopy in all cases in which a discrepancy between cytology and colposcopy exists; the squamous-columnar junction is not visible in presence of positive cytology; a glandular lesion is suspected. When abnormal findings in the cervical canal can be identified, targeted biopsies or oriented curettage may be performed in the office-based setting and then the patient may be scheduled to conization. The correct localization of the lesions permits to modulate the cone excision, allowing for an ultra-conservative surgical intervention and thus preserving the future fertility of the woman. Differently, in all cases in which no endocervical lesions can be identified, we suggest to perform a wide conization and to avoid blind curettage, which - beside being highly invasive - does not offer a reduction of the false negative rate.

Finally, we can say that the prospects of endocervicoscopy are numerous considering its safeness, slight invasiveness and its high diagnostic accuracy. Furthermore, this technique is relatively easy to learn and thus it may widespread rapidly.

## REFERENCES

1. Orlandi C et al. *Cervical pathology and viruses*. Europ J Gynaecol Oncol, 8: 135; 1987.
2. Reich O, Pickel H., Lahousen M, Tamussino K, Winter R. *Cervical intraepithelial neoplasia III: long term outcome after cold-knife conization with clear margins*. Obstet Gynecol, 97: 428-30; 2001.
3. Reich O, Lahousen M, Pickel H, Tamussino K, Winter R. *Cervical intraepithelial neoplasia III: long term follow-up after cold-knife conization with involved margins*. Obstet Gynecol, 99: 193-96; 2002.
4. Moore BC, Higgins RV, Laurent SL, Marroum MC, Bellit P. *Predictive factors from cold knife conization for residual cervical intraepithelial neoplasia in subsequent hysterectomy*. Am J Obste Gynecol, 173: 361-8; 1995.
5. Das N, Naik R, Jackson S, De Barros Lopes A, Monaghan JM, Godfrey KA, Hatem MH. *Recurrent smear abnormalities where repeat loop treatment is not possible: is hysterectomy the answer?* Gynecol Oncol, 97 (3): 751-4; 2005.
6. Manivasagam R, Flynn PM, Bolger BS. *Hysterectomy for abnormal cervical cytology following treatment for cervical intraepithelial neoplasia*. J Obstet Gynecol, 24 (1): 72-3; 2004.
7. Pellicano M, Guida M, Zullo F, Lavitola G, Cirillo D, Nappi C. *Carbon dioxide versus normal saline as a uterine distension medium for diagnostic vaginoscopic hysteroscopy in infertile patients: a prospective, randomized, multicenter study*. Fertility and Sterility, 79 (2): 418-21; 2003.
8. Guida M, Di Spiezio Sardo A, Acunzo G, Sparice S, Bramante S, Piccoli R, Bifulco G, Cirillo D, Pellicano M, Nappi C. *Vaginoscopic versus traditional office hysteroscopy: a randomized controlled study*. Hum Reprod, Jul 22; 2006.
9. Izzo S, Negrotti S, Stanco D, Ardovino I. *L'esame dell'endocervice: la colposcopia dell'endocollo, ovvero l'endocervicoscopia*. In Patologia cervicovaginale: dal laboratorio alla clinica. Atti del XVII Congresso della SICPCV, Vecchione A, Villani C, Frega A. Eds, Masson Ed, Roma, pp 119-30; 2002.
10. Walzer P, Dexeus S, De Palo G, Barrasso R, Campion M, Girardi F, Jakob C, Roy M. *International terminology of colposcopy: an update report from international federation for cervical pathology and colposcopy*. Obstet Gynecol 101: 175-7; 2003.
11. Wright T.C., Cox J. T., Massad L.S., Twiggs L.B., Wilkinson E.J. *ASCCP sponsor consensus conference: 2001. Consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities*. JAMA 2002; 287: 2120-2129.
12. Linee Guida della Società Italiana di Colposcopia e Patologia Cervico-Vaginale (SICPCV) 2006. *Gestione della paziente con Pap Test anormale*. La Colposcopia in Italia, 1: 5-14; 2006.
13. Drescher CW, Peter WA, Roberto JA. *Contribution of endocervical curettage in evaluating abnormal cervical cytology?* Obstet Gynecol 62: 343-7; 1983.
14. Oyer R, Hanjani R. *Endocervical curettage: does it contribute to the management of patients with abnormal cervical cytology?* Gynecol Oncol 25: 204-11; 1986.
15. Ayoubi JM, Cayrol MH, Meddonu M, Benevent JB, Degoy J, Pons JC. *Role of endocervical curettage in the screening for cervical cancer: a propos for a series of 31 cases*. Gynecol Obstet Fertil 28 (5): 455-59; 2000.
16. Frumowitz M, Asher-Walsh C, Smith D, Wertheim I, Resnik E, Singh D. *The utility of endocervical curettage in routine colposcopy of patients with satisfactory examination*. Obstet Gynecol 97 (suppl 1): 915; 2001.
17. Mogensen ST, Bak M, Dueholm M, Frost L, Knoblauch NO, Praest J, Svanholm H. *Cytobrush and endocervical curettage in the diagnosis of dysplasia and malignancy of the uterine cervix*. Acta Obstet Gynecol Scand, 76 (1): 69-73; 1997.



18. Skjelestad FE et al. Residual and recurrent disease after laser-conization for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol*, 90 (3): 428-33; 1997.

**Table 1:** International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy - Colposcopic Classification (Barcelona 2002).

<b>1. NORMAL COLPOSCOPIC FINDINGS</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Original squamous epithelium</li> <li>- Columnar epithelium</li> <li>- Transformation zone</li> </ul>
<b>2. ABNORMAL COLPOSCOPIC FINDINGS</b> <p><b>Atypical transformation zone grade 1 (ZTA-G1)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Flat acetowhite epithelium</li> <li>- Fine mosaic</li> <li>- Fine punctuation</li> <li>- Iodine partial positivity</li> </ul> <p><b>Atypical transformation zone grade 2 (ZTA-G2)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dense acetowhite epithelium</li> <li>- Coarse mosaic</li> <li>- Coarse punctuation</li> <li>- Iodine negativity</li> <li>- Atypical vessels</li> </ul>
<b>3. COLPOSCOPIC FEATURES SUGGESTIVE OF INVASIVE CANCER</b>
<b>4. UNSATISFACTORY COLPOSCOPY</b>

**Table 2:** Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy for endocervicoscopy and blind endocervical curettage.

	<b>Endocervicoscopy</b>	<b>Blind endocervical curettage</b>
Sensitivity	0.83	0.66
Specificity	0.86	1
PPV	0.99	1
NPV	0.29	0.54
Accuracy	0.83	0.76

POSITIVE ENDOCERVICOSCOPY (Group A): 74 patients

9 lesions TA

Histological diagnosis after targeted or directed biopsy		Histological diagnosis after conization			
		Neg.	CIN 1	CIN 2	CIN 3
Neg.	4	1	3	-	-
CIN 1	3	-	3	-	-
CIN 2	2	-	1	1	-
CIN 3	-	-	-	-	-

58 lesions

Histological diagnosis after targeted or directed biopsy		Histological diagnosis after conization			
		Neg.	CIN 1	CIN 2	CIN 3
Inadeg.	2	-	-	-	-
CIN 1	-	-	-	-	-
CIN 2	15	-	-	13	-
CIN 3	41	-	-	-	45

3 "jump lesions" TA

Histological diagnosis after targeted or directed biopsy		Histological diagnosis after conization			
		Neg.	CIN 1	CIN 2	CIN 3
Inadeg.	-	-	-	-	-
CIN 1	-	-	-	-	-
CIN 2/3	3	-	-	3	-
CIN 3	-	-	-	-	-

4 lesions suggestive of possible

Histological diagnosis after targeted or directed biopsy		Histological diagnosis after conization			
		CIN 1	CIN 2/3	AIS	K microinv
CIN 1	-	-	-	-	-
CIN 2/3	-	-	-	-	-
Gland.atipia	2	-	-	2	-
K microinv	2	-	-	-	2

NEGATIVE

ENDOCERVICOSCOPY (Group B): 21 patients

NEGATIVE blind endocervical curettage		Histological diagnosis after conization		
		Neg.	CIN 2	CIN 3
Neg.	6	6	-	-
Metaplasia	2	-	2	-
Cervicitis	2	-	1	1
Inadequate	1	-	-	1

POSITIVE blind endocervical curettage		Histological diagnosis after conization		
		CIN 2	CIN 2/3	CIN 3
CIN 1	1	1	-	-
CIN 2	3	2	1	-
CIN 3	6	-	-	6

**Figure 1: The results arising from the final histology (on conization) compared with those obtained from targeted biopsies and blind endocervical curettage**

## BIBLIOGRAFIA

1. Solomon D, Nayar R. *Il sistema Bethesda per refertare la citologia cervicale*. CIC Edizioni Internazionali.
2. Koss LG, Gompel C. *Introduction to Gynecologic Cytopathology with Histologic and Clinical correlation*. Williams & Wilkins.
3. Cano A, Serra V, Rivera J, et al. *Expression of estrogen receptors, progesterone receptors, and estrogen receptor associated protein in the human cervix during the menstrual cycle and menopause*.
4. Cohen MS, Britigan BE, Bean K. *Preliminary observation on lactoferrin secretion in human vaginal mucus: variation during the menstrual cycle, evidence of hormonal regulation, and implications for infection with Neisseria Gonorrhoeae*. Am J Obstet Gynecol, 157(5): 1122-5; 1987.
5. Prabhala RH, Wira CR. *Cytokine regulation of the mucosal immune system: in vivo stimulation by interferon-gamma of secretory component and immunoglobulin A in uterine secretions and proliferation of lymphocytes from spleen*. Endocrinology, 129(6): 2915-23; 1991.
6. Kutteh WH, Moldoveanu Z, Mestecky J. *Mucosal immunity in the female reproductive tract: correlation of immunoglobulins cytokines and reproductive hormone in human cervical mucus around the time of ovulation*. AIDS Res Hum Retrovirus, 14: 51-55; 1998.
7. Lang TJ: *Estrogen as an Immunomodulator*. Clinical Immunology, 113: 224-230; 2004.
8. Franklin RD, Kutteh WH. *Characterization of immunoglobulins and cytokines in human cervical mucus: influence of exogenous and endogenous hormones*. Journal of Reproductive Immunology, 42: 93-106; 1999.
9. Fichorova RN, Tucker LD, Anderson DJ. *The molecular basis of nonoxynol-9-induced vaginal inflammation and its possible relevance to human immunodeficiency virus type 1 transmission*. J Infect Dis, 184: 418 ; 2001.



10. Castle PE, Hillier SL, Rabe LK, et al. *An association of cervical inflammation with high grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papilloma virus (HPV)*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 10: 1021-27; 2001.
11. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X et al. *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. N Engl J Med, 348: 518-527; 2003.
12. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB and Gissman L Chapter I. *HPV in the etiology of human cancer*. Vaccine, 24(suppl. 3): S1-S7; 2006.
13. Giles M and Garland G. *Human papillomavirus infection: an old disease, a new vaccine*. Aust N J Obstet Gynecol, 46: 180-185; 2006.
14. Stanley M. *HPV vaccines*. Rev Med Virol, May-Jun 16(3): 139-49; 2006.
15. Stanley M. *Genital papillomavirus- prospects for vaccination*. Current opinion in infectious Diseases, 10: 55-61; 1997.
16. Klaes R et al. *Overexpression of  $p16^{INK4a}$  as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix*. Int J Cancer, 92: 276-284; 2001.
17. Sano T et al. *Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions*. Am J Pathol, 153: 1741-48; 1998.
18. Beutner KR et al. *Human Papillomavirus and human disease*. Am J Med, 102(5A): 9-15; 1997.
19. Walboomers JM et al. *Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 189: 12-19; 1999.
20. Bosch FX et. *The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer*. J Clin Pathol, 55: 244-65; 2002.
21. Havlir DV, Richman DD et al. *Viral dynamics of HIV implications for drug development and therapeutic strategies*. Ann. Intern. Med, 124: 984-994; 1996.
22. European Society for Infectious Disease in Obstetrics and Gynaecology. *Recommendations for the diagnosis and treatment of HPV infections of the female tract*. ESIDOG J vol 4+5 (suppl) 2/2001.

23. Nardo G, Vignato A, Testa B, Zanetti D, Lestani M. *Citologia in strato sottile ThinPrep 2000 versus pap test convenzionale. Nostra esperienza su 10884 casi nell'ambito dello screening organizzato di Verona. La Colposcopia in Italia -SICPCV-*, N. 2: 6-10; anno XIX.
24. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Kjaer SK, Munoz N. *Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia*. Vaccine, 26S: 1-16; 2008.
25. Castellsague X, de Sanjose S, Aguado T, Louie KS, Bruni L, Muñoz J, et al. *HPV and Cervical Cancer in the World*. 2007 Report. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Vaccine, 25(Suppl 3); 2007.
26. IARC upcoming meetings: Lifestyle Factors; Special report: policy: A review of human carcinogens—Part B: biological agents. May 2009.
27. Tornesello ML, Duraturo ML, Salatiello I, Buonaguro L, Lo Sito S, Botti G et al. *Analisis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer*. J Med Virol, 74: 117-126; 2004.
28. Resnick RM, Cornelissen MT, Wright DK, Eichinger GH, Fox HS, ter Schegger J et al. *Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers*. J Natl Cancer Inst, 82: 1477-1484; 1990.
29. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. *The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR*. J Gen Virol, 76: 1057-1062 ;1995.
30. Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL et al. *Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree*. J Clin Microbiol, 29: 1765-1772; 1991.

31. Chen Z, Teraï M, Fu L, Herrero R, DeSalle R, Burk RD. *Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses*. J Virol, 79: 7014-7023; 2005.
32. Wright TC, Bosch FX, Franco EL et al. *Chapter 30: HPV vaccines and screening in the prevention of cervical cancer; conclusions from a 2006 workshop of international experts*. Vaccine, Vol 24: Suppl. 3 S251-S261; Aug 2006.
33. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N and Franceschi S. *Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis*. Br J Cancer, 1: 63-73; 2003.
34. Stanley M, Lowy DR and Frazer I. *Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms*. Vaccine, 24(suppl.3): S106-S113; 2006.
35. Dillner J. *The serological response to papillomaviruses*. Semin Cancer Biol, 6: 423-430; 1999.
36. Villa LL, Ault KA, Giuliano AR, Costa RL, Petta CA et al. *Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16 and 18*. Vaccine, 24: (27-28)5571-5583; 2006.
37. Schwarz TF, Leo O. *Immune response to human papillomavirus after prophylactic vaccination with AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine: Improving upon nature*. Gynecol Oncol; 2008.
38. Carter JJ, Koutsky LA et al. *Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection*. J Infect Dis, 181(6): 1911 ; 2000.
39. Giannini SL, Hanon E, et al. *Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only*. Vaccine, 24(33-34): 5937-49; 2006.
40. Harper DM. *High and Sustained Protection Up to 6.4 years with GSK's AS04 Adjuvanted Cervical Cancer Vaccine*. Presented at: Society for Gynecologic Oncology, Tampa, FL, USA, 9-12 -2008.

41. Pedersen C, Petaja T, Strauss G et al. *Immunization of early adolescent females with human papillomavirus type 16 and 18 L1 virus-like particle vaccine containing AS04 adjuvant*. J Adolesc Health, 40: 564–571; 2007.
42. De Carvalho N, C Roteli-Martins, et al. *Immunogenicity and safety of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine up to 7.3y*. IPvC, Malmo, Sweden, 08-14 2009.
43. Gall SA, Teixeira J, Wheeler CM et al. *Substantial impact on precancerous lesions and HPV infections through 5.5 years in women vaccinated with the HPV-16/18 L1 VLP AS04 candidate vaccine*. Presented at: American Association for Cancer Research (AACR). Los Angeles, CA, USA, 14–18 2007.
44. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM et al. *Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised controlled trial*. Lancet, 367: 1247–1255; 2006.
45. Einstein MH. *Acquired immune response to oncogenic human papillomavirus associated with prophylactic cervical cancer vaccines*. Cancer Immunol Immunother, 57: 443–451; 2008.
46. Dessy F et al. *Correlation between direct ELISA, single epitope-based inhibition ELISA and pseudovirion-based neutralization assay for measuring anti-HPV-16 and anti-HPV-18 antibody response after vaccination with the AS04-adjuvanted HPV-16/18 cervical cancer vaccine*. Human Vaccines, 4(6): 425-434; November/December 2008.
47. Pastrana D et al. *Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18*. Virology, 321: 205– 216; 2004.
48. Opalka D, Lachman CE, MacMullen SA, Jansen KU, Smith JF, Chirmule N, Esser MT. *Simultaneous quantitation of antibodies to neutralizing epitopes on virus-like particles for human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 by a multiplexed luminex assay*. Clin Diagn Lab Immunol, 10(1):108; 2003.
49. Einstein M. *Comparison of neutralizing antibody and memory B-cell responses induced by Cervarix™ and Gardasil™ human papillomavirus*

- (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18–45 years: Study overview. XXV IpvC, Malmo, Sweden 08-14 May 2009.
50. Reisinger KS, Block SL, Lazcano-Ponce E et al. *Safety and persistent immunogenicity of a quadrivalent human papillomavirus types 6, 11, 16, 18 L1 virus-like particle vaccine in preadolescents and adolescents*. *Pediatr Infect Dis J*, 26(3) : 201–209 ; 2007.
  51. Schiller JT, Castellsagué X et al. *An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results*. *Vaccine*, 26S: K53–K61; 2008.
  52. Hendrix SL. *Assessing HPV Vaccine Efficacy and Safety*. *J Am Osteopath Assoc*, 108(suppl 2): S8-S12; 2008.
  53. Moscicki AB, M.D. *HPV Vaccines: Today and in the Future*. *Journal of Adolescent Health*, 43: S26–S40; 2008.
  54. Harper MD. *Vaccini profilattici anti-papillomavirus umano per la prevenzione del cancro della cervice uterina: revisione di studi clinici di fase II e di fase III*. [www.futuremedicine.com](http://www.futuremedicine.com) 2008.
  55. Brown DR, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, et al. *The Impact of Quadrivalent Human Papillomavirus (HPV; Types 6, 11, 16, and 18) L1 Virus-Like Particle Vaccine on Infection and Disease Due to Oncogenic Nonvaccine HPV Types in Generally HPV-Naive Women Aged 16–26 Years*. *The Journal of Infectious Diseases*, 199; 2009.
  56. Wheeler CM, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, et al. *The Impact of Quadrivalent Human Papillomavirus (HPV; Types 6, 11, 16, and 18) L1 Virus-Like Particle Vaccine on Infection and Disease Due to Oncogenic Nonvaccine HPV Types in Sexually Active Women Aged 16–26 Years*. *The Journal of Infectious Diseases*, 199: 936–44; 2009.
  57. Jenkins D. *A review of cross-protection against oncogenic HPV by an HPV-16/18 AS04-adjuvanted cervical cancer vaccine: Importance of virological and clinical endpoints and implications for mass vaccination in cervical cancer prevention*. *Gynecologic Oncology*, 110: S18–S25; 2008.
  58. Skinner SR, Apter D, Chow SN, Wheeler C, Dubin C, for the HPV PATRICIA Study Group: *Cross-protective efficacy of Cervarix™ against*

- oncogenic HPV types beyond HPV-16/18*. Congress: IPvC, Malmö, Sweden, 08-14 May 2009.
59. Herrero R. *Human Papillomavirus (HPV) Vaccines: Limited Cross-Protection against Additional HPV Types*. The Journal of Infectious Diseases, 199; 919 -22; 2009.
  60. Cotran, Kumar, Collins, Robbins. *Le basi patologiche delle malattie*. VI Edizione.
  61. Commissione Oncologica Nazionale: *proposte operative in tema di prevenzione secondaria del cervico-carcinoma uterino*. In *Linee Guida elaborate dalla Commissione oncologica nazionale, in applicazione di quanto previsto dal Piano Sanitario Nazionale per il triennio 1994-96, relativo all'azione programmata «Prevenzione e cura delle malattie oncologiche», concernenti l'organizzazione della prevenzione e dell'assistenza in oncologia*. Supplemento ordinario della Gazzetta Ufficiale n 127 del 1° giugno 1996.
  62. Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato e le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano. Provvedimento 8 marzo 2001. *Accordo tra il ministero della Sanità e le regioni e province autonome di Trento e Bolzano sulle linee-guida concernenti la prevenzione, la diagnostica e l'assistenza in oncologia*. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, 2 maggio 2001.
  63. Coleman D, Day N, Douglas G, Formery E, Lynge E, Phillp J, Segnan N. *European Guidelines for quality assurance in cervical cancer screening*. Europ J Cancer, 29A (4): S1-S38; 1993.
  64. The Council of the European Union. *Council Recommendation of 2 december on cancer screening*. J Eur Unon, 878: 34-8; 2003.
  65. Bucci L, Serafini M. Tumori, 78: 239; 1992.
  66. Andersen W, Frierson H, Barber S, Tabbarah S, Taylor P, Underwood P. *sensitività and specificità of endocervical curettage and the endocervical brush for the evaluation of the endocervical canal*. Am J Obstet Gynecol, 159 (3): 702-7; 1988.



67. Bamford PH, Beilby J, et al. *The natural history from cervical intraepithelial neoplasia as determined by cytology and colposcopic biopsy*. Acta Cytol, 27: 482; 1983.
68. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright TJr, Young N. *The 2001 Bethesda System terminology for reporting results of cervical cytology*. JAMA, 287: 2114-19; 2002.
69. Nappi C. et al. *Ostetricia e Ginecologia*. Idelson-Gnocchi Edizione 2005.
70. Hoskins WJ, et al. *Principles and practice of Gynecologic Oncology*. Lippincott Williams & Wilkins Fourth Edition.
71. Melnikow J, Nuovo J, William AR, et al. *Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a metanalysis*. Obstet Gynecol, 92: 727; 1998.
72. National Cancer Institute Workshop. *The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses*. JAMA, 262: 931-934; 1989.
73. Kurman R, Solomon D. *The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: definitions, criteria and explanatory notes for terminology and specimen adequacy*. New York, Springer Verlag 1994.
74. Kurman R, Henson D, Herbst A, Noller KL, Schiffman MH. *Interim guidelines for management of abnormal cervical cytology*. JAMA, 271: 1866-1869; 1994.
75. Bosch FX, Manos MM, de Sanjose S et al. *Risk factors for cervical in Colombia and Spain*. Int J Cancer, 52 (5): 750-58; 1995.
76. Prendiville W, Ritter J, Tatti S, Twiggs L. *Management del Pap-test anormale. Linee guida della SICPCV*. In: Colposcopy: Management Options, 205; 2005.
77. Affinito P, Di Spiezio Sardo A, Di Carlo C, Sammartino A, Tommaselli GA, Bifulco G, Loffredo A, Loffredo M, Nappi C. *Effects of hormone replacement therapy on ocular function in postmenopause*. Menopause, 10: 482-487; 2003.

78. Nappi C, Di Spiezio Sardo A, Guerra G, Di Carlo C, Bifulco G, Acunzo G, Sammartino A, Galli V. *Comparison of intranasal and transdermal estradiol on nasal mucosa in postmenopausal women*. Menopause, 11: 447-455; 2004.
79. Dresang LT. *Colposcopy: an evidence-based update*. J Am Board Fam Pract, 18: 383-392; 2005.
80. Wright TC Jr, Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ ASCCP-Sponsored Consensus Conference. *2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities*. JAMA, 287: 2120-2129; 2002.
81. Flynn K, Rimm D. *Diagnosis of ASCUS in women over age 50 is less likely to be associated with dysplasia*. Diagn. Cytopathol, 24: 132-136; 2001.
82. Walker JL, Wang SS, Schiffman M, Solomon D. *ASCUS-LSIL Triage Study Group. Predicting absolute risk of CIN3 during post-colposcopic follow-up: results from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS)*. Am J Obstet Gynecol, 195: 341-348; 2006.
83. Cibas ES, Browne TJ, Bassichis MH, Lee KR. *Enlarged squamous cell nuclei in cervical cytologic specimens from perimenopausal women ("PM Cells"): a cause of ASC overdiagnosis*. Am J Clin Pathol, 124: 58-61; 2005.
84. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. *Cancer Statistics 2004*. Ca Cancer J Clin, 54: 8-29; 2004.
85. Menezes GA, Wakely PE, Stripe DM, Nuovo GJ. *Increased incidence of atypical Papanicolaou tests from Thinpreps of postmenopausal women receiving hormone replacement therapy*. Cancer Cytopathol, 93: 357-363; 2001.
86. Smith JS, Green J, Berrington de Gonzalez A et al. *Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review*. Lancet, 361: 1159-1167; 2003.
87. Moodley M, Moodley J, Chetty R, Herrington CS. *The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: A review*. Int J Gynecol Cancer, 13: 103-110; 2003.

88. Saunders N, Anderson D, Gilbert L, Sharp F. *Unsatisfactory colposcopy and the response to orally administered oestrogen: a randomized double blind placebo controlled trial*. Br J Obstet Gynaecol, 97: 731-733; 1990.
89. Milam MR, Pollock JW, Nick AM, Scott T, Jones HW 3<sup>rd</sup>. *The effect of hormonal contraception on the adequacy of colposcopic examination of the cervix*. Am J Obstet Gynecol, 192: 1368-1369; 2005.
90. Johnston EI, Logani S. *Cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance in perimenopausal and postmenopausal women: lessons learned from human Papillomavirus DNA testing*. Cancer, 111: 160-165; 2007.
91. Moss S, Gray A, Legood R, Vessey M, Patnick J, Kitchener H. *Liquid Based Cytology/Human Papillomavirus Cervical Pilot Studies Group. Effect of testing for human papillomavirus as a triage during screening for cervical cancer: observational before and after study*. BMJ, 332: 83-85; 2006.
92. Kim JJ, Wright TC, Goldie SJ. *Cost-effectiveness of alternative triage strategies for atypical squamous cells of undetermined significance*. JAMA, 287: 2382-2390; 2002.
93. Hanselaar A, Task force n°12. *Features of successful organized screening programs*. International Consensus Conference on Fight Against Cervical Cancer, Chicago, march 18-22, 2000.
94. ACOG Committee Opinion. *New Pap test screening techniques*. N 206, august 1998.
95. Boyle P, Leon ME, Maisonneuve P, Autier P. *Cancer control in women, update 2003*. Int J Gynecol Obstet, 83 (suppl 1): 179; 2003.
96. Gadducci A, Bandoni F, Maggino T, Romagnolo C, Sartori E, Zola P. *Percorsi clinici in Ginecologia Oncologica*. EDITEAM 2007.
97. Cox JT. *Epidemiology of cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus*. Bailliere's Clin Obstet Gynaecol, 9: 121; 1995.
98. Orlandi C et al. *Cervical pathology and viruses*. Europ J Gynaecol Oncol, 8: 135; 1987.

99. Van Nagell JR Jr, Powell DE, Gallion HH, Elliott DG, Donaldson ES, Carpenter AE, Higgins RV, Kryscio R, Pavlik EJ. *Small cell carcinoma of the uterine cervix*. Cancer, 62(8): 1586-93; 1988.
100. Sevin, B U, M W. Method et al. *Efficacy of radical hysterectomy as treatment for patients with small cell carcinoma of the cervix*. Cancer, 77(8): 1489-93; 1996.
101. Reagan JW, Hamonic MJ, Wentz WB. *Analytical study of cells n cervical squamous-cell cancer*. Lab Invest, 6: 241–250; 1957.
102. Delaloge S, Pautier P et al. *Neuroendocrine small cell carcinoma of the uterine cervix: what disease? What treatment? Report of ten cases and a review of the literature*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 12(6): 357-62; 2000.
103. Kasamatsu T, Sasajima Y et al. *Surgical treatment for neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix*. Int J Gynaecol Obstet, 99(3): 225-8; 2007.
104. Viswanathan AN, Deavers MT et al. *Small cell neuroendocrine carcinoma of the cervix: outcome and patterns of recurrence*. Gynecol Oncol, 93(1): 27-33; 2004.
105. Albores-Saavedra J, Martinez-Benitez B et al. *Small cell carcinomas and large cell neuroendocrine carcinomas of the endometrium and cervix: polypoid tumors and those arising in polyps may have a favorable prognosis*. Int J Gynecol Pathol, 27(3): 333-9; 2008.
106. Straughn Jr JM, Richter HE, Conner MG, Meleth S, Barnes MN. *Predictors of outcome in small cell carcinoma of the cervix—A case series*. Gynecol Oncol 83:216– 20; 2001.
107. Wang H L and Lu DW. *Overexpression of c-kit protein is an infrequent event in small cell carcinomas of the uterine cervix*. Mod Pathol, 17(6): 732-8, 2004.
108. Tangjitgamol SP, Ramirez T et al. *Expression of HER-2/neu, epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2, estrogen receptor, and progesterone receptor in small cell and large cell neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix: a clinicopathologic and prognostic study*. Int J Gynecol Cancer, 15(4): 646-56; 2005.

109. Crowder S, Tuller E. *Small cell carcinoma of the female genital tract*. Semin Oncol, 34: 57–63; 2007.
110. Samlal RA, Van Der Velden J, Van Eerden T, Schilthuis MS, Gonzalez D, Lammes FB. *Recurrent cervical carcinoma after radical hysterectomy: an analysis of clinical aspects and prognosis*. Int J Gynecol Cancer, 8:78–84; 1998.
111. Hoskins PJ, Swenerton KD, Pike JA et al. *Small-cell carcinoma of the cervix: fourteen years of experience at a single institution using a combined-modality regimen of involved-field irradiation and platinum-based combination chemotherapy*. J Clin Oncol, 21: 3495–3501; 2003.
112. Lee JM, Lee KB et al. *Prognostic factors in FIGO stage IB-IIA small cell neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix treated surgically: results of a multi-center retrospective Korean study*. Ann Oncol, 19(2): 321-6; 2008.
113. Bermudez A, Vighi S, Garcia A, Sardi J. *Neuroendocrine cervical carcinoma: a diagnostic and therapeutic challenge*. Gynecol Oncol, 82: 32–39; 2001.
114. Wang KL, Yang YC, Wang TY et al. *Neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix: a clinicopathologic retrospective study of 31 cases with prognostic implications*. J Chemother, 18: 209–216; 2006.
115. Krane JF, Lee KR, Sun D, Yuan L, Crum CP. *Atypical glandular cells of undetermined significance. Outcome predictions based on human papillomavirus testing*. Am J Clin Pathol, 121: 87-92 2; 2004.
116. Hemelt BA, Bengneaud WP, Finan MA. *Is colposcopy always necessary with atypical glandular cells of undetermined significance on Papanicolaou smears?* Prim Care Update Ob Gyns, 8: 18-21; 2001.
117. Hammoud MM, Haefner HK, Michael CW, Ansbacher R. *Atypical glandular cells of undetermined significance. Histologic findings and proposed management*. J Reprod Med, 47: 226-70; 2002.
118. Lee KR. *Symposium part 4: Should pathologists diagnose endocervical preneoplastic lesions “less than” adenocarcinoma in situ? Counterpoint*. Int J Gynecol Pathol, 22: 22-24; 2003.

119. Ioffe OB, Sagae S, Moritani S, Dahamoush L, Chen TT, Silverberg SG. *Proposal of a new scoring scheme for the diagnosis of noninvasive endocervical glandular lesions*. Am J Surg Pathol, 27: 452- 60; 2003.
120. Ioffe OB, Sagae S, Moritani S, Dahamoush L, Chen TT, Silverberg SG. *Symposium part 3: Should pathologists diagnose endocervical preneoplastic lesions "less than" adenocarcinoma in situ? Point*. Int J Gynecol Pathol, 22: 18-21; 2003.
121. Jones BA, Novis DA. *Follow-up of abnormal gynaecologic cytology: a college of American Pathologists Q-probes study of 16132 cases from 306 laboratories*. Arch Pathol Lab Med, 124: 665-671; 2000.
122. Jones BA, Novis DA. *Cervical biopsy-cytology correlation: a College of American Pathologists Q-probes study of 22439 correlations in 348 laboratories*. Arch Pathol Lab Med, 20: 523-531; 1996.
123. Hare AA, Duncan AR, Sharp AJ. *Cytology suggestive of glandular neoplasia: outcomes and suggested management*. Cytopathology, 14: 12-8; 2003
124. Chhieng DG, Elgert P, Cohen JM, Cangiarella JF. *Clinical significance of atypical glandular cells of undetermined significance in postmenopausal women*. Cancer, 93(1): 1-7; 2001.
125. Renshaw AA, Mody DR, Lozano RL, Volk EE, Walsh MK, Davey DD, Birdsong GG. *Detection of adenocarcinoma in situ of the cervix in Papanicolaou tests: comparison of diagnostic accuracy with other high-grade lesions*. Arch Pathol Lab Med, 128: 153-7; 2004.
126. Tam KF, Cheung AN, Liu KL, Ng TY, Pun TC, Chan YM, Wong LC, Ng AW, Ngan HY. *A retrospective review on atypical glandular cells of undetermined significance (AGUS) using the Bethesda 2001 classification*. Gynecol Oncol, 91: 603-7; 2003.
127. Ronnet BM, Manos MM, Ransley JE et al. *Atypical glandular cells of undetermined significance (agus)*. Hum Pathol, 30: 816-825; 1999.
128. Zweizig S, Noller K, Reale F, Collis S, Resseguie L. *Neoplasia associated with atypical glandular cells of undetermined significance cervical cytology*. Gynecol Oncol, 65: 314- 318; 1997.



129. Mathers ME, Johnson SJ, Wadehra V. *How predictive is a cervical smear suggesting glandular neoplasia?* Cytopathology, 13: 83-91; 2002.
130. Pirog EC, Isacson C, Szaboles MJ, Kleter B, Quint W, Richart RM. *Proliferative activity of benign and neoplastic endocervical epithelium and correlation with HPV DNA detection.* Int J Gynecol Pathol, 21: 22-6; 2002.
131. Mattosinho de Castro Ferraz G, Focchi J, Stavale JN, Nicolau SM, Rodriguez de Lima G, Baracat EC. *Atypical glandular cells of undetermined significance. Cytologic predictive value for glandular involvement in high grade squamous intraepithelial lesions.* Acta Cytol, 47: 154-8; 2003.
132. Consiglio Direttivo SICPCV Gestione della paziente con Pap test anormale – *Linee Guida 2002.* La Colposcopia in Italia, 1: 6-28; 2002.
133. Levine L, Lucci JA 3rd, Dinh TV. *Atypical glandular cells: new Bethesda terminology and management guidelines.* Obstet Gynecol Surv, 58: 399-406; 2003.
134. Gingrich PM. *Management and follow-up of abnormal Papanicolaou tests.* J Am Med Women Assoc, 59: 54-60; 2004.
135. Bertrand M, Likhresh GM, Colgan TJ. *The anatomic distribution of cervical adenocarcinoma in situ: implication for treatment.* Am J Obstet Gynecol, 157: 21-6; 1987.
136. Lee KR, Flynn CE. *Early invasive adenocarcinoma of the cervix.* Cancer, 89: 1048-55; 2000.
137. Boselli F. *Colposcopia e fisiopatologia del tratto genitale inferiore.* Mediacom Ed Casinalbo (Mo), 63-94; 2003.
138. Visiolin CB, Zappa M, Ciatto S, Iossa, Crocetti E. *Increasing trends of cervical adenocarcinoma incidence in Central Italy despite extensive screening programme.* Cancer detect Prev, 28(6): 461-4; 2004
139. Tranbaloc P. *Adenocarcinome in situ de l'endocol. Difficultes du diagnostic cyto-histologique.* Gynecol Obstet Fertil, 30: 308-15; 2002.
140. Oliveira ER, Derchain SF, Rabelo-swantos SH, Westin MC, Zefirino LC, Campos EA, Syrjanen KJ. *Detection of high-risk human papillomavirus (HPV) DNA by Hybrid Capture II in women referred due to atypical*

- glandular cells in the primary screening.* Diagn Cytopathol, 31(1): 19-22; 2004.
141. Madeleine NM, Daling JR, Schwartz SM, Shere K, McKnight B, Carter JJ, Wipf GC, Critchlow CW, Mc Dougall JK, Galloway DA. *Human papilloma virus and long term oral contraceptive use increase the risk of adenocarcinoma in situ of the cervix.* Cancer Epidemiol Biomark Prev, 10: 171-7; 2001.
  142. Andersen ES, Nielsen K. *Adenocarcinoma in situ of the cervix: a prospective study of conization as definitive treatment.* Gynecol Oncol, 86: 365-9; 2002.
  143. Ruba S, Schoolland M, Allpress S, Sterret G. *Adenocarcinoma insitu of the uterine cervix: screening and diagnostic errors in Papanicolaou smears.* Cancer, 102(5): 280-7; 2004.
  144. Sopracordevole F. *Percorso diagnostico terapeutico delle pazienti con lesioni ghiandolari.* La Colposcopia in Italia, 3: 5-11; 2004.
  145. Sopracordevole F, Mendizza A. *Lesioni ghiandolari endocervicali occulte intraepiteliali o invasive e terapia delle H-SIL.* In: A. Vecchione, C Villani, A Frega Eds: Patologia cervicovaginale. Atti del XVII Congresso della SICPCV. Masson Ed, Milano, pp 175-176; 2002.
  146. Azodi M, Chambers SK, Rutherford TJ, Kohorn EI, Schwartz PE, Chambers JT. *Adenocarcinoma in situ of the cervix: Management and outcome.* Gynecol Oncol, 73: 348-353; 1999.
  147. Kennedy AW, Eltabbakh GH, Biscotti CV, Wirth S. *Invasive adenocarcinoma of the cervix following LLETZ (large loop excision of the transformation zone) for adenocarcinoma in situ.* Gynecol Oncol, 58: 274-277; 1995.
  148. Hocking GR, Hayman JA, Ostor AG. *Adenocarcinoma in situ of the uterine cervix progressing to invasive adenocarcinoma.* Aust NZ J Obstet Gynaecol, 36: 218-220; 1996.
  149. Goldstein NS, Mani A. *The status and distance of cone biopsy margins as a predictor of excision adequacy for endocervical adenocarcinoma in situ.* Anat Pathol, 109: 727-32; 1998.

150. Kennedy AW, Biscotti CV. *Further study of the management of cervical adenocarcinoma in situ*. Gynecol Oncol, 86: 361-64; 2002.
151. SOGC Clinical Practice Guidelines. *Guidelines on adenocarcinoma in situ of the cervix: clinical features and review of management*. JSOGC, 77: 699-706; 1999.
152. McHale MT, Le TD, Burger RA, Gu M, Rutgers JL, Monk BJ. *Fertility sparing treatment for in situ and early invasive adenocarcinoma of the uterine cervix*. Obstet Gynecol, 98: 726-31; 2001.
153. Creasman WT. *New gynecologic cancer staging*. Gynecol Oncol, 58: 157-8; 1995.
154. Berek JS, Hacker NF, Fu YS, Sokale JR, Leuchter RC, Lagasse L. *Adenocarcinoma of the uterine cervix: histologic variables associated with lymph node metastasis and survival*. Obstet Gynecol, 65: 46-52; 1985.
155. Kasper HG, DinTV, Dorethy MG, Hannigan EV, Kumar D. *Clinical implications of tumor volume measurement in stage I adenocarcinoma of the cervix*. Obstet Gynecol, 81: 296-300; 1993.
156. Hopkins MP, Morley GW. *A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix*. Obstet Gynecol, 77: 912-7; 1991.
157. Utsugi K, Shimizu Y, Akiyama F, Hasumi K. *Is the invasion depth in millimeters valid to determine the prognosis of the early invasive cervical adenocarcinoma? A case of recurrent FIGO stage IA1 cervical adenocarcinoma*. Gynecol Oncol, 82(1): 205-7; 2001.
158. Belega J, Michael H, Hurteau J, Moore DH, Santiesteban J, Sutton GP, Look KY. *The risk of nodal metastasis in early adenocarcinoma of the uterine cervix*. Int J Gynecol Cancer, 14(1): 104-9; 2004.
159. Schorge JO, Lee KR, Sheets EE. *Prospective management of stage IA(1) cervical adenocarcinoma by conization alone to preserve fertility: a preliminary report*. Gynecol Oncol, 78(2): 217-20; 2000.
160. Kondo T, Hashi A, Murata SI, Nakazawa T, Yuminamochi T, Nara M, Hoshi K, Katoh R. *Endocervical adenocarcinoma associated with lobular endocervical glandular hyperplasia: a report of four cases with*

- histochemical and immunohistochemical analyses. Mod Pathol*, doi:10.1038/modpathol.38004 03 (advanced online publication); 2005.
161. Ostor AG. *Early invasive adenocarcinoma of the uterine cervix*. Int J Gynecol Pathol, 19(1): 29-38; 2000.
  162. Landis SH, Murray T, Golden S, Wingo PA. *Cancer Statistics, 1999*. Cancer Stat, 49: 8-31; 1999.
  163. Parkin Dm, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Yound J. *Cancer incidence in five continents*. Vol 7 Lyon: IARC; 1997.
  164. Silverberg SG, Kurman RJ. *Tumors of the uterine corpus and gestational trophoblastic disease*. Atlas of tumor pathology, AFIP; 1998.
  165. Griffiths et al. *Oncologia Ginecologica MOSBY ITALIA*, 131-150; 2002.
  166. Emons G, Fleckenstein G, Hinney B, Huschmand A, Heyl W. *Hormonal interactions in endometrial cancer*. Endocr Relat Cancer, 7: 227-242; 2000.
  167. Sherman ME. *Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach*. Mod Pathol, 13: 295-308; 2000.
  168. Pescetto G, De Cecco L, Pecorari et al. *Ginecologia e Ostetricia*. Società Editrice Universo, Roma; 2001.
  169. Ambrosini et al. *Ostetricia e Ginecologia Idelson-Gnocchi*; 2004.
  170. Staging classification and clinical practice guidelines of gynaecologic cancers by FIGO Committee on Gynecologic Oncology, November 2003.
  171. FIGO news. *Corpus cancer staging*. Int J Gynecol Obstet, 28: 190; 1989.
  172. Ayhan A, Taskiran C, Celik C, Yuce K. *The long term survival of women with surgical stage II endometrioid type endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 93: 9-13; 2004.
  173. Staging classification and clinical practice guidelines of gynaecologic cancers by FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2006.
  174. Brand A. *Diagnosis of endometrial cancer with abnormal vaginal bleeding*. SOGC Clinical Practice Guidelines Policy Statement, 86; 2000.
  175. Gull. *Transvaginal ultrasonography of the endometrium in women with postmenopausal bleeding: is it always necessary to perform an endometrial biopsy?* Am J Obstet Gynecol, 182: 509-515; 2000.

176. Günter Schmidt. *Diagnosi differenziale ecografia*. II edizione, Verduci editore: 415; 2006.
177. Società Italiana di Ecografia Ostetrica e Ginecologica, Manuale di ecografia ginecologica; SIEOG 2006.
178. Tantini C, Mencaglia L, Branconi F, et al. *Depistage diagnostico e terapeutico della metrorragia nella donna in periodo climaterico*. Boll AIEG, 9: 203; 1982.
179. Nasri MN. *Correlazioni tra i reperti ecografici e l'istopatologia endometriale nelle donne in menopausa*. Br J Obstet Gynaecol, 96: 1333-38; 1995.
180. Torrejon R. *The value of hysteroscopic exploration for abnormal uterine bleeding*. J Am Assoc Gynecol Laparose, 4: 453-456; 1997.
181. Clark TJ, Voit D, Gupta JK, Hyde C, Song F, Khan KS. *Accuracy of hysteroscopy in the diagnosis of endometrial cancer and hyperplasia: a systematic quantitative review*. JAMA, 288: 1610-21; 2002.
182. Guida M, Acunzo G, Di Spiezio Sardo A, Lavitola G, Frangini S, Sparice S, Annunziata G, Nappi C. *Hysteroscopic diagnosis of cervical involvement in the staging of endometrial carcinoma*. Tumori, May-Jun 4 (3); 2005.
183. Litta P et al. *Role of hysteroscopic with endometrial biopsy to rule out endometrial cancer in postmenopausal women with abnormal uterine bleeding*. Maturitas, 2005.
184. Hricak H, Rubinstein LV, Gherman CM, Karstaedt N. *MR imaging evaluation of endometrial carcinoma: results of an NCI cooperative study*. Radiology, 179: 829-832; 1991.
185. Manfredi R, Gui B, Maresca G, Fanfani F e Bonomo L. *Endometrial cancer: magnetic resonance imaging*; 2005.
186. Hirano Y, Kubo K, Hirai Y et al. *Preliminary experience with gadolinium-enhanced dynamic MR imaging for uterine neoplasm*. Radiographics, 12: 243-256; 1992.
187. Manfredi R, Mirk P, Maresca G et al. *Local-regional staging of endometrial carcinoma: role of MR imaging in surgical planning*. Radiology, 231: 372-378; 2004.

188. Hasumi K, Mutsuzawa M, Chen HG et al. *Computed tomography in the evaluation and treatment of endometrial carcinoma*. Cancer, 50: 904-908; 1982.
189. Bidziski M, Lemieszczuk B. *The value of transvaginal ultrasonography (TVS) in the assessment of myometrial and cervical invasion in corpus uterine neoplasma*. Eur J Gynaecol Oncol, 14 Suppl: 86-91; 1993.
190. Gabrielli S. et al. *Transvaginal sonography vs. hysteroscopy in the preoperative staging of endometrial carcinoma*. Ultrasound Obstet Gynecol; 7: 443-446; 1996.
191. Akihiko Kikuchi MD et al. *Intrauterine sonography for preoperative assessment of cervical invasion in endometrial carcinoma*. Gynecologic Oncology, 65: 415-420; 1996.
192. Toky T et al. *A comparative study of preoperative to assess cervical invasion by endometrial carcinoma*. Br J Obstet Gynecol, May 105 (5): 512-6; 1998.
193. Morimura Y et al. *The value of preoperative diagnostic procedures for cervical involvement in uterine corpus carcinoma*. Fukushima J med Sci, Dec 46(1-2): 1-11; 2000.
194. Nagar H, Dobbs S, McClelland HR, Price J, McClellage WG, Grey A. *The diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging in detecting cervical involvement in endometrial cancer*. Gynecol Oncol, Nov 103(2): 431-4; 2008.
195. Savino L, Scarselli G, Branconi F, Locatelli F, Di Tommaso M, Mencaglia L, Tantini G. *Usefulness of hysteroscopy in endometrial adenocarcinoma staging*. Eur J Gynecol Oncol, 3: 210-3; 1982.
196. Burghardt E, Nickel H, Girardi F. *Colposcopia e patologia cervicale*. CIC Edizioni Internazionali, Roma 1999.
197. Pixley E. *Morphology of the fetal and prepubertal cervical-vaginal epithelium*. In: J.A. Jordan, A. Singer, etc. The cervix. Philadelphia: saunders, 75; 1976.



198. Campion MJ, Mc Cance DJ, Cuzich J, Singer J. *Progressive potential of mild cervical atypia: prospective cytological, colposcopic and virological study*. Lancet, II: 237; 1986.
199. Castano-Almendral A, Muller H, Naujoks H, Castano-Almendral JL. *Topographical and hystological localization of dysplasias, carcinoma in situ, microinvasions, and microcarcinomata*. Gynecol Oncol, 1: 320; 1973.
200. Walton RJ. *Report of Task Force Reconvened by the Healt Service Directorate (Health Service and Promotion Branch, Governement of Canada); cervical cancer screening programs, 1982*. Ottawa, Canada, Minster of National Health and Welfare, 1982.
201. De Palo G. *Manuale di colposcopia e patologia dei tumori del tratto genitale inferiore*. II Edizione Masson, Milano; 1993.
202. Stafl A, Wilbanks G. *International terminology of colposcopy*. The Cervix, 9: 91; 1991.
203. Walker P, Dexeus S, De Palo G, Barrasso R, Campion M, Giardi F, Jakob C, Roy M. *International terminology of colposcopy: an update report from international federation for cervical pathology and colposcopy*. Obstet Gynecol, 101: 175-77; 2003.
204. Mogensen ST, Bak M, Dueholm M, Frost L, Knoblauch NO, Praest J, Svanholm H. *Cytobrush and endocervical curettage in the diagnosis of dysplasia and malignancy of the uterine cervix*. Acta Obstet Gynecol Scand, 76 (1): 69-73; 1997.
205. Klam S, Arsenau J, Mansour N, Franco E, Frenczy A. *Comparison of endocervical curettage and endocervical brushing*. Obstet Gynecol, 96 (1): 90-94; 2000.
206. Drescher CW, Peter WA, Roberto JA. *Contribution of endocervical curettage in evaluating abnormal cervical cytology?* Obstet Gynecol, 62: 343-7; 1983.
207. Oyer R, Hanjani R. *Endocervical curettage: does it contribute to the management of patients with abnormal cervical cytology?* Gynecol Oncol, 25: 204-211; 1986.

208. Ayoubi JM, Cayrol MH, Meddonu M, Benevent JB, Degoy J, Pons JC. *Role of endocervical curettage in the screening for cervical cancer: apropos for a series of 31 cases*. Gynecol Obstet Fertil, 28 (5): 455-59; 2000.
209. Frumowitz M, Asher-Walsh C, Smith D, Wertheim I Resnik E, Singh D. *The utility of endocervical curettage in routine colposcopy of patients with satisfactory examination*. Obstet Gynecol, 97 (4 suppl 1): 915; 2001.
210. Piccoli R, Boselli F, Santoro MG. *La terapia chirurgica ginecologica ambulatoriale*. ELI Ed Internazionali, 1997.
211. Lagasse LD, Creasman WT, Shingleton HM, Ford JH, Blessing JA. *Results and complications of operative staging in cervical cancer: experience of the Gynecologic Oncology Group*. Gynecol Oncol, 9 (1): 90-98; 1980.
212. Reich O, Lahousen M, Pickel H, Tamussino K, Winter R. *Cervical intraepithelial neoplasia III: long term follow-up after cold-knife conization with involved margins*. Obstet Gynecol, 99: 193-96; 2002.
213. Skjelestad FE et al. *Residual and recurrent disease after laser-conization for cervical intraepithelial neoplasia*. Obstet Gynecol, 90 (3): 428-33; 1997.
214. Moore BC, Higgins RV, Laurent SL, Marroum MC, Bellit P. *Predictive factors from cold knife conization for residual cervical intraepithelial neoplasia in subsequent hysterectomy*. Am J Obste Gynecol, 173: 361-8; 1995.
215. Das N, Naik R, Jackson S, De Barros Lopes A, Monaghan JM, Godfrey KA, Hatem MH. *Recurrent smear abnormalities where repeat loop treatment is not possible: is hysterectomy the answer?* Gynecol Oncol, 97 (3): 751-4; 2005.
216. Manivasagam R, Flynn PM, Bolger BS. *Hysterectomy for abnormal cervical cytology following treatment for cervical intraepithelial neoplasia*. J Obstet Gynecol, 24 (1): 72-3; 2004.
217. Pellicano M, Guida M, Zullo F, Lavitola G, Cirillo D, Nappi C. *Carbon dioxide versus normal saline as a uterine distension medium for diagnostic vaginoscopic hysteroscopy in infertile patients: a prospective, randomized, multicenter study*. Fertility and Sterility, 79 (2): 418-21; 2003.

218. Guida M, Di Spiezio Sardo A, Acunzo G, Sparice S, Bramante S, Piccoli R, Bifulco G, Cirillo D, Pellicano M, Nappi C. *Vaginoscopic versus traditional office hysteroscopy: a randomized controlled study*. Hum Reprod, Jul 22; 2006.
219. Izzo S, Negrotti S, Stanco D, Ardovino I. *L'esame dell'endocervice: la colposcopia dell'endocollo, ovvero l'endocervicoscopia*. In Patologia cervicovaginale: dal laboratorio alla clinica. Atti del XVII Congresso della SICPCV, Vecchione A, Villani C, Frega A. Eds, Masson Ed, Roma, pp 119-30; 2002.
220. Huskisson EC. *Measurements of pain*. Lancet, 2: 1127-31; 1974.
221. Walzer P, Dexeus S, De Palo G, Barrasso R, Campion M, Girardi F, Jakob C, Roy M. *International terminology of colposcopy: an update report from international federation for cervical pathology and colposcopy*. Obstet Gynecol 101: 175-7; 2003.
222. Linee Guida della Società Italiana di Colposcopia e Patologia Cervico Vaginale (SICPCV) 2006. *Gestione della paziente con Pap Test anormale*. La Colposcopia in Italia, 1: 5-14; 2006.
223. Orbo A, Arnesen T, Arnes M, Strame B. *Resection margin in conization as prognostic marker for relapse in high-grade dysplasia of the uterine cervix in northern Norway: a retrospective long term follow-up material*. Gynecol Oncol, 93: 479-83; 2004.
224. Johnson N, Khalili M, Hirschowitz L, Ralli F, Porter R. *Predicting residual disease after excision of cervical dysplasia*. BJOG, 110: 952-55; 2003.
225. Ghiringhello R, Arisio R, Piccoli R. *Estensione della lesione e stato dei margini: valore prognostico*. ATTI de: il secondo livello nello screening per il cervico-carcinoma e l'ambulatorio di colposcopia- 25 settembre 2004.
226. Paraskevidis E, Kalantaridou SN, Paschopoulos M, Zikopoulos K, Diakomanolis E, Dalkalitsis N, Makrydimas G, Pappa L, Malamou-Mitsi V, Agnantis NJ. *Factors affecting outcome after incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia*. Eur J Gynaecol Oncol, 110: 952-55; 2003.